



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

의학박사 학위논문

PI(4,5)P₂에 의한 TREK 포타슘
이온통로의 활성 조절에 대한
C-말단 아미노산의 역할

Roles of C-terminal amino acids in the
PI(4,5)P₂ - dependent regulation of
TWIK-related two-pore domain
K⁺ channel

2018 년 2 월

서울대학교 대학원
의과학과 의과학전공
우 주 한

A thesis of the Degree of Doctor of Philosophy

Roles of C-terminal amino acids in the
PI(4,5)P₂ - dependent regulation of
TWIK-related two-pore domain
K⁺ channel

PI(4,5)P₂ 에 의한 TREK 포타슘
이온통로의 활성화에 대한
C-말단 아미노산의 역할

February 2018

The Department of Biomedical Sciences,
Seoul National University
College of Medicine
Joo Han Woo

PI(4,5)P₂ 에 의한 TREK 포타슘
이온통로의 활성화에 대한
C-말단 아미노산의 역할

지도 교수 김 성 준

이 논문을 의학박사 학위논문으로 제출함

2017년 10월

서울대학교 대학원
의과학과 의과학전공
우 주 한

우주한 의 의학박사 학위논문을 인준함

2018년 2월

위원장	서 인석	(인)
부위원장	김 성진	(인)
위원	김 항 래	(인)
위원	이 용 석	(인)
위원	강 동 복	(인)


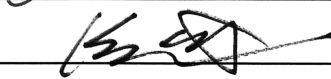

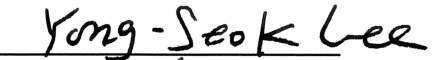

Roles of C-terminal amino acids in the
PI(4,5)P₂ – dependent regulation of
TWIK-related two-pore domain
K⁺ channel

by
Joo Han Woo

A thesis submitted to the Department of
Biomedical Sciences in partial fulfillment of the
requirements for the Degree of Doctor of
Philosophy in Medical Science at Seoul National
University College of Medicine

February 2018

Approved by Thesis Committee:

Professor		Chairman
Professor		Vice chairman
Professor		
Professor		
Professor		

국문 초록

TREK (TWIK-related two-pore domain K^+ channel)은 background-type K^+ 채널 단백질이며, 안정막 전압 형성과 흥분성 세포의 재분극에 관여한다. TREK 은 막전압 의존성은 없으나, 세포막 $PI(4,5)P_2$, 세포 내 pH (pHi), 온도, 불포화지방산, 세포막 신전 등에 의해 활성이 조절된다. 세포막 안쪽의 TREK C-말단이 다양한 자극들에 의한 활성 조절을 매개한다고 알려져 있다. 특히, TREK 활성 조절에 C-말단 근위부의 전하를 띤 아미노산들이 매우 중요하다고 알려졌으나, 정확한 위치와 조절 방향은 명확하지 않다. TREK 은 낮은 활성 상태를 바탕으로 다양한 자극들에 의해 활성이 증가된다. 이를 통하여 세포의 막전압을 조절하는 기능을 담당한다. TREK 의 흥분성 조절에 대한 연구들은 많으나, 억제성 조절 기전 및 이와 관련된 C-말단의 세부 구조는 알려져 있지 않다. 이 연구는 C-말단의 음성 및 양성 아미노산들 중, $PI(4,5)P_2$ 와 pHi 의존적 조절을 담당하는 잔기들을 발견하고, 그 조절 기전에 대한 새로운 제안을 목적으로 수행하였다.

- 1) Whole-cell 막전압 고정법으로 TREK 전류($I_{TREK, w-c}$) 측정뿐만 아니라, inside-out 조건 측정($I_{TREK, i-o}$)에서도 세포 내 ATP (1-3 mM)는 TREK 활성을 감소시켰다. PI-kinase 억제제(Wortmannin)는 ATP에 의한 $I_{TREK, i-o}$ 억제를 방지하였고, $PI(4,5)P_2$ 자체는 $I_{TREK, i-o}$ 를 강력히 억제하였다. 따라서AT는 PI-kinase 의존적 $PI(4,5)P_2$ 합성을 통하여 TREK 을 억제하는 것으로 사료된다. 그런데, $PI(4,5)P_2$ 를 탈인산화 시키는 voltage sensitive phosphatase 를 TREK-2 와 공발현 시킨 후 $PI(4,5)P_2$ 를 탈인산화하면, $I_{TREK, w-c}$ 는 처음에는 증가하지만, 이어서 다시 억제되었다. $I_{TREK, i-o}$ 측정 시 poly-L-lysine (PLL) 투여로 $PI(4,5)P_2$ 로 인한 음성막지질을 중화 시키면 $I_{TREK, i-o}$ 는 완전히 억제된다. 이 상태에서 $PI(4,5)P_2$ 를 점차 높은 농도로 처

리하면, ITREK, i-o 은 단계적으로 증가하다가 억제되어서, PI(4,5)P₂ 농도에 따른 양방향성 조절을 시사한다. 즉, PI(4,5)P₂의 존재는 TREK 활성화에 필수적이지만, 생리적 농도에서는 TREK 활성을 낮게 유지하고 있다. PI(4,5)P₂ 생성을 매개로 하는 세포 내 ATP 의 TREK 활성화 억제는 내인적으로 TREK 을 발현하는 성상교세포와 B 림프구에서도 확인되었다.

- 2) TREK 의 C-말단 근위부, 특히 사람의 hTREK-2 기준으로 323-361 번 잔기들에 양전하성(cationic) 아미노산이 많이 존재하여 PI(4,5)P₂의 정전기적 영향을 매개할 가능성이 높다. 330 번 Lys 을 Ala 으로 치환(K330A) 하였더니, K330A ITREK-2, i-o 는 이미 높은 활성을 보였으며, ATP 에 의한 활성화 억제와 세포 내 산성화에 의한 활성화 증가가 나타나지 않았다. Whole-cell 막전압 고정 조건에서도, K330A ITREK-2, w-c 은 이미 높은 활성을 나타내면서, 아라키돈산, 2-APB, 산성 pHe 에 의한 추가적인 활성화 증가가 덜 나타났다. TREK-1 의 상응 잔기 치환 (K315A)도 동일한 변화들을 유발했다. TREK-2 K330 이나 TREK-1 K315 는 세포 내 ATP 가 있는 생리적 조건에서 PI(4,5)P₂ 를 매개로 TREK 활성을 억제하는데 중요한 것으로 생각된다. 흥미롭게도, 이보다 원위부 C-말단 부위에 연속된 세 개 (355-7) 의 Arg 을 Ala 으로 치환(R355-7A)한 경우, TREK-2 활성도는 평소보다 낮아질 뿐만 아니라, ATP 가 없어도 ITREK-2, i-o 와 ITREK-2, w-c 는 계속 낮게 유지되었다. 하지만 다른 활성화 자극들(산성 pHi, 2-APB, 아라키돈산)의 효과는 잘 나타났다. 더욱 흥미롭게도, R355-7A 경우, K330A 를 추가로 도입하더라도 기저 활성이 낮은 상태는 그대로였고, 2-APB 나 산성 pHi 에 의한 활성화는 여전히 잘 나타났다. 이 결과들로부터, K330 은 상대적으로 높은 농도의 PI(4,5)P₂ 에 의한 억제를 매개하고, R355-7 은 낮은 농도의 PI(4,5)P₂에 의한 활성화를 매개하는 것으로 추정되었다.

3) 산성 pHi 에 의한 활성화에서 TREK-1 C-말단의 Glu (E317)이 중요하다라는 기존의 보고는 있으나, TREK-2 는 제대로 확인되지 않았다. E317 에 상응하는 TREK-2 의 332 번 Glu 을 Ala 으로 치환(E332A) 하면, ITREK-2, i-o 와 ITREK-2, w-c 는 모두 자극과 상관없이 높은 활성도를 보이며, 산성 pHi 에 더 이상 반응하지 않았다. 흥미롭게도 세포 내 ATP 에 억제도 나타나지 않았다. TREK-1 과 달리, TREK-2 는 또 다른 C-말단 Glu (E335) 치환(E335A)에도 산성 pHi 에 의한 활성화가 부분적으로 줄어들었다. 그러나 E335A 는 ATP 에 의한 억제는 여전히 나타났다. 앞서 관찰한 TREK-2 의 R355-357A 에 E332A 를 추가 치환하여도 낮은 기저활성 상태는 그대로였으며, 산성 pHi 에 의한 활성화는 여전히 나타나지 않았다.

본 연구를 통하여, TREK-2 C-말단에서 PI(4,5)P₂에 의한 상반적인 조절을 담당하는 두 부위의 양전하 잔기들(K330, R355-357)을 새롭게 찾아내었다. 산성 pHi 에 의한 활성화를 담당하는 E332 의 핵심적 역할과 함께 E335 의 보조적 역할도 발견하였다. R355-357 의 양전하 의존적 작용은 TREK-2 의 기저활성에 필수적이지만, E332 를 매개로 하는 산성 pHi 효과나 다른 활성화제들의 작용과는 상관 없는 것으로 나타났다. 보다 명확한 상호작용 기전을 밝히려면, 향후 C-말단의 정밀한 분자구조 규명이 필요하다.

* 본 내용은 Woo et al., 2016, Pflugers Arch - Eur J Physiol; Woo et al., 2017, Pflugers Arch - Eur J Physiol 학술지에 출판 완료된 내용임

주요어: 포타슘 이온통로, K2P 이온통로, TREK 이온통로, C-말단, PI(4,5)P₂, 세포 내 산성화

목차

국문 초록	i
목차	iv
도표 및 그림 목록	v
약어	viii
제 1 부. PI(4,5)P ₂ - 의존적 TREK 조절의 상반된 현상을 담당하는 C-말단의 양전하성 아미노산	
서론	2
결과	12
고찰	36
제 2 부. 산성 pHi 에 의한 TREK 조절을 매개하는 C-말단의 음전하성 아미노산	
서론	46
결과	48
고찰	55
재료 및 방법	60
참고 문헌	65
영문 초록	75

도표 및 그림 목록

Figure 1. Classification of K^+ channels.....	2
Figure 2. Structure and subgroups of K2P channel family	4
Figure 3. Increase of TREK-2 whole-cell current (ITREK-2, w-c) by diluting intracellular ATP.....	13
Figure 4. Inhibition of hTREK-2 by applying ATP to the cytoplasmic side of i-o patches.....	15
Figure 5. Suppression of ITREK-2, i-o by $PI(4,5)P_2$ application .	17
Figure 6. Inhibition of TREK-1 by intracellular ATP and $PI(4,5)P_2$ application	19
Figure 7. Dual effects of Dr-VSP and M3 muscarinic receptor activation on ITREK-2.....	21
Figure 8. Inhibition of TREK-2 by ATP and $PI(4,5)P_2$ in mouse astrocytes and WEHI-231 B lymphocytes	24
Figure 9. Hypothetical models of $PI(4,5)P_2$ and ATP-dependent regulation of TREK-2.....	26
Figure 10. Sequence alignment of proximal C-terminal (pCt) domains in hTREK-1 and hTREK-2.....	27
Figure 11. Responses of ITREK-2, i-o and ITREK-1, i-o to acidic pH with ATP in cationic residue neutralizing mutants of hTREK-2 and hTREK-1.	28

Figure 12. Whole-cell patch clamp studies comparing the effects of 2-APB on the ATP-and acidic pHi-resistant mutants of hTREK-2	30
Figure 13. Whole-cell patch clamp studies comparing the effects of pHe on the ATP-and acidic pHi-resistant mutants of TREK-2	31
Figure 14. Indiscriminate inhibition of ATP-resistant cationic amino acid mutants by exogenous PI(4,5)P ₂	32
Figure 15. Responses of ITREK-2, i-o and ITREK-1, i-o to acidic pHi with ATP and ITREK-2, w-c on the triple arginine mutants.	34
Figure 16. Responses of K330A/R355-7A ITREK-2, i-o to acidic pHi with ATP and K330A/R355-7A ITREK-2, w-c to 2-APB	35
Figure 17. Cartoon summary of TREK-2 gating regulated by interaction between pCt Lys330, Arg355-7 and PI(4,5)P ₂	42
Figure 18. Responses of ITREK-2, i-o and ITREK-1, i-o to acidic pHi in WT and mutants with pCt Glu substituted with Ala	48
Figure 19. Responses of ITREK-2, i-o and ITREK-1,i-o to acidic pHi with ATP in WT and Glu neutralizing mutants	51
Figure 20. Whole-cell patch clamp studies comparing the effects of 2-APB and pHe on the ATP-and acidic pHi-resistant mutants of hTREK-2	53

Figure 21. Indiscriminate inhibition of ATP-resistant anionic amino acid mutants by exogenous PI(4,5)P ₂	54
Figure 22. Responses of E332A/R355-7A ITREK-2, i-o to acidic pH with ATP and E332A/R355-7A ITREK-2, w-c to 2-APB	54
Figure 23. Cartoon summary of TREK-2 gating regulated by interaction between pCt Lys330, Glu332, Arg355-7 and PI(4,5)P ₂	56
Table 1. List of mutation sites in the TREK C-terminal	62
Table 2. Experimental solutions and compositions	64

약어 및 부록

2-APB	-----	2-Aminoethoxydiphenyl borate
AA	-----	Arachidonic acid
Ala	-----	Alanine, A
Arg	-----	Arginine, R
Anionic	-----	음전하성
Cationic	-----	양전하성
Dr-VSP	-----	<i>Danio rerio</i> Voltage sensitive phosphatase
Glu	-----	Glutamic acid, E
i-o	-----	Inside out patch clamp, 내측-외향 패치클램프
K2P	-----	Two-pore-domain potassium channel is a family
Kir	-----	Inward-rectifier potassium channel
Kv	-----	Voltage-gated potassium channel
Lys	-----	Lysine, K
PI-kinase	-----	Phosphatidylinositol - kinases
PI(4,5)P ₂	-----	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate
Point mutation	-----	선택적 변형
TREK	-----	TWIK-related K ⁺ channel
Voltage- Clamp	-----	막전압 고정법
w-c	-----	Whole-cell patch Clamp, 전세포 패치클램프

제 1 부. PI(4,5)P₂ - 의존적 TREK 조절의
상반된 현상을 담당하는 C-말단의 양전하성
아미노산

서론

포타슘 이온통로의 종류 및 기능

포타슘 이온통로(K^+ 채널)는 세포막 단백질 중의 하나로서 세포막을 경계로 포타슘 이온(K^+)을 수송하며 세포의 부피조절, 호르몬분비, 심작박동조절, 시냅스 신호전달, 그리고 근 수축 등에 중요한 역할을 한다. K^+ 채널들은 구조와 기능에 따라 세 종류의 큰 집단으로 나눌 수 있다(Fig. 1).

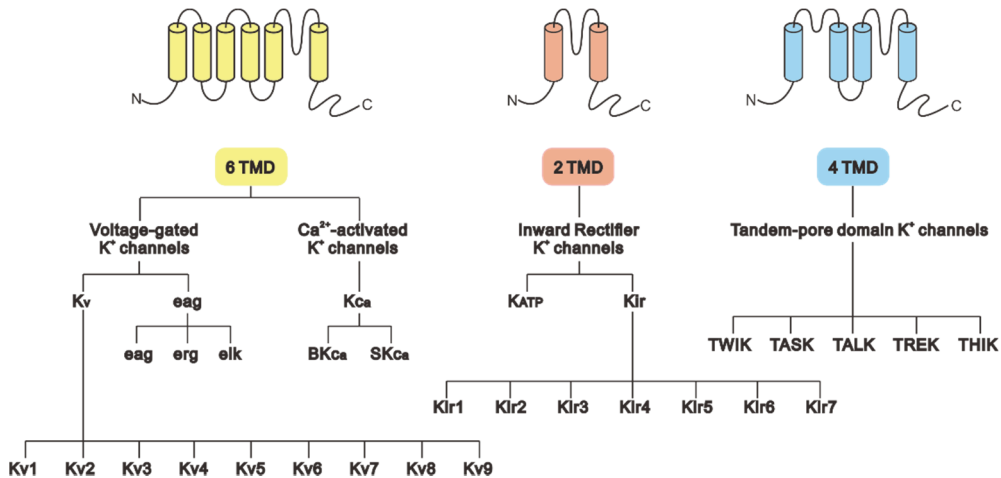


Figure 1. Classification of K^+ channels

먼저 전압에 따라 이온이 이동하는 통로를 여닫는 K^+ 채널집단(Kv family)의 공통 구조를 보면, 여섯 개의 막 관통 부위 (transmembrane segments; S1–S6)와 한 개의 이온이 통과하는 부분(pore)으로 구성되어 있다. 이중 네 번째 transmembrane segment에 해당하는 S4에는 양전하를 띠는 아미노산들이 규칙적이고 반복적으로 존재하고 있으며, 이 부분이 전위 의존적인 이온통로 (채널)의 개폐를 담당한다(Logothetis et al., 1992).

두 번째로 내향성으로 정류하는 (inwardly rectifying) K^+ 채널 집

단(Kir family)이 있다. 이 채널은 구조는 두 개의 transmembrane segments와 하나의 pore를 형성하는 부위로 구성되어 있다. 세포질에 존재하는 마그네슘 이온(Mg^{2+})이나 polyamine 으로 인하여 외향 전류가 차단된다. 따라서 내향 전류가 더욱 잘 나타나는 특성을 가지고 있다(Matsuda et al., 1991).

세 번째 집단으로는 K2P (tandem pore domain K^+ channel)가 있다. K2P 채널들은 생체 내 압력, 지질, 산성화, 그리고 산소 등에 따라 채널의 활성이 조절되며 세포의 생리적인 기능에서 중요한 역할을 담당한다(Fink et al., 1996).

K2P 이온 통로의 종류 및 기능

K2P 이온통로는 두개의 단위 단백질이 모여서 하나의 이온통로를 만든다. 단위 구조를 살펴보면 네 개의 transmembrane segments를 가지고 있으며, 두 개의 pore 부분이 있다. K2P K^+ 통로는 채널의 열리는 정도가 전위에 의존하지 않는 경향을 보인다(Lesage et al., 1996). 이러한 특징들은, 이 K^+ 채널들이 휴지전위에서도 항상 열려 있어 세포의 막전압을 K^+ 에 대한 평형 전위에 가까운 약 -80 mV를 유지시키는 기능을 담당하고 있다. 그리고 다른 K^+ 채널들과는 다르게 TEA 약물에 의하여 억제되지 않는다. 이로 인해 K2P 채널들을 배경 채널(background channel)이라고도 하며, 실제 다양한 세포에서 K2P 채널들이 안정막 전압을 형성하고, 조절하는 기능을 하는 것으로 알려져 있다(Fink et al., 1998). 그리고 knock out 동물 실험을 통하여 urine 생성, 마취, 통증 감각, 우울증, 그리고 neuroprotection에 K2P 채널이 관여되고 있음이 발표되었다. 대부분의 K2P 채널 관련 실험들은 중추신경계와 말초신경계 뉴런에서의 역할에 집중되고 있다.

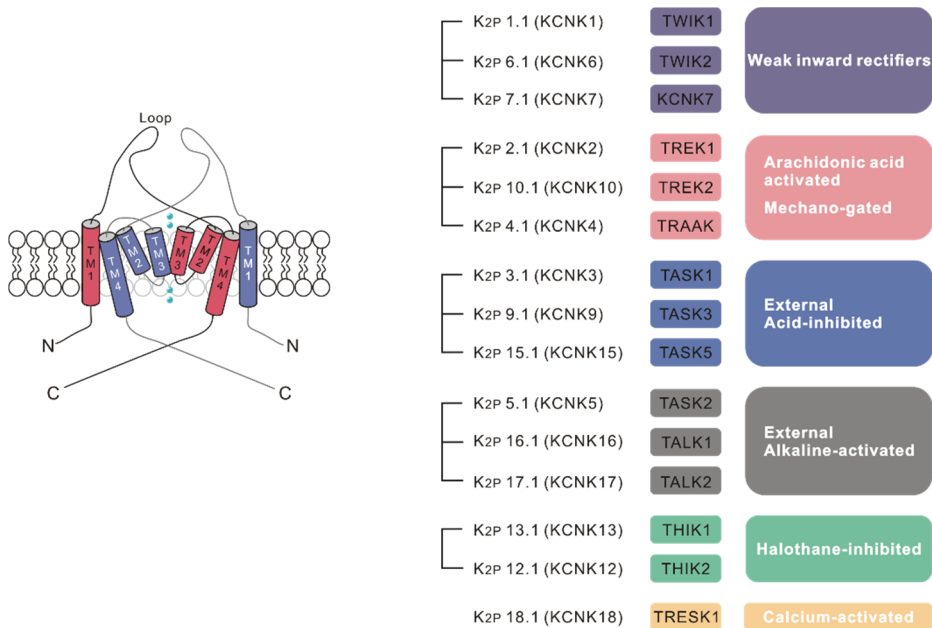


Figure 2. Structure and subgroups of K2P channel family

K2P 채널은 총 17개의 채널이 있으며 유전자 서열의 유사성과 특성에 따라서 6가지의 중 그룹으로 구분된다(Fig. 2). TWIK (tandem of P domain in a weak inward rectifying K^+ channel)은 K2P 채널들 가운데 가장 먼저 발견 되었으며 전류가 세포 안쪽으로 약하게 흐르는 특성을 가지고 있다(Lesage et al., 1996b). 최근에는 TWIK 은 homodimer 의 형태로는 세포막에 발현되어도 기능을 하지 않으며 다른 K2P 채널들과 heterodimer를 이루면서 채널의 역할을 한다고 알려진다(Du et al., 2016).

TALK (TWIK-related alkaline pH-activated K^+ channel)는 세포 외부의 염기화에 의하여 활성이 증가되는 특징이 있다. 이와 유사하게, TASK 는 세포 외액의 산성화에 민감하게 억제되는 특징을 가진다(Duprat et al., 1997). THIK (Tandem pore domain halothane-inhibited K^+ channel)는 흡입마취제로 사용되는 할로세인(halothane)에 의하여 활성이 억제되는 특성을 가지고 있으며 다른 자극들에 대해서는 민감하지 않다(Buckler et al., 2000). TRESK

(TWIK-related spinal cord K^+ channel)는 사람의 척수에 많이 발견되어 있다. $Gq\alpha$ 수용체 자극 시 일어나는 세포 내 칼슘 증가는 calcineurin 의 세린 / 트레오닌 아미노산이 탈인산화되며 활성이 증가되기 때문이다(Czirjak et al., 2004).

TREK은 (TWIK-related K^+ channel) TWIK과 매우 유사한 특징을 보이지만 세포막에 가해지는 물리적인 자극이나 불포화지방산 등에 의하여 활성화 된다(Patel et al., 1998).

TREK family 의 종류 및 기능

TREK family는 1996년 Fink 등에 의하여 TREK-1이 처음 밝혀졌다(Fink et al., 1996). TREK은 K^+ 에 선택적인 채널이었으며 예전에 marine snail *Aplysia* 의 뉴런에서 기록되었던 S - 전류와 많은 특성들을 공유하고 있었다. TREK-1은 세포막 stretch, PUFA (polyunsaturated fatty acid), 마취제 등에 활성이 증가되는 반면에 cAMP에 의해 활성이 억제되는 특성을 나타내었다(Patel et al., 1998). Thalamus (Bista et al., 2015), 면역세포, 심장(Decher et al., 2015), 그리고 adrenal cortex (Bandulik et al., 2015) 등에 발견 되어 있다.

TREK-2는 TREK-1과의 아미노산 서열의 유사성이 65% 이다. 그리고 TREK-2는 TREK-1과 같이 C-말단에 세포 내 pH와 세포막 신전 자극을 감지하는 부분을 가지고 있다(Kim et al., 2001). TREK-1과 TREK-2는 arachidonic acid (AA, 아라키돈산)이나 phosphatidyl inositol 4,5-bisphosphate ($PI(4,5)P_2$)와 같은 phospholipid에 의해 활성이 조절되며 세포 내 산성화에 채널의 활성이 증가되는 공통적인 특성을 가지고 있다. 그러나 TREK-2는 TREK-1의 C-말단에 비하여 긴 C-말단을 가지고 있으며, 세포 외부 산성화에 따라 채널 활성이 증가된다. 반면에 TREK-1은 세포 외부 산성화에 따라 채널 활성이 억제된다(Sandoz et al., 2009). 또한 TREK-2는 TREK-1에 비하여 2-aminoethoxy diphenylborate (2-APB)에 대하여 높은 민감도

(sensitivity)를 가지고 있다(Beltran et al., 2013).

마지막으로 TRAAK (TWIK-related arachidonic acid activated K^+ channel)은 아라키돈산에 의하여 활성화 된다. TRAAK은 TREK-1, TREK-2와 같이 PUFA, 온도 그리고 물리적자극에 의하여 채널의 전류가 증가하는 특성을 가지고 있다. 그러나 TRAAK은 마취제로 사용되는 halothane 에 활성화 되지 않는다. 그리고 selective serotonin reuptake inhibitors (paroxetine, fluoxetine, chlorpromazine)와 Gs 혹은 Gq 결합 수용체 자극을 통한 PKA 혹은 PKC 인산화에 의해서 는 TRAAK 의 활성이 억제되지 않는다(Garry et al., 2007; Kennard et al., 2005; Noel et al., 2011; Patel et al., 1998; Sandoz et al., 2011; Thummler et al., 2007).

TREK family 의 활성조절

TREK family는 기본적으로 낮은 채널 활성을 유지하고 있으며 세포 내 · 외부의 물리 화학적 자극에 의하여 채널의 활성이 증가된다. TREK 활성을 조절하는 세포 외부로부터의 자극으로는 PUFA, 신전 자극, 온도 자극 및 세포 외액의 산성도 등 이 있다. 그리고 TREK 활성을 조절하는 세포 내 자극으로는 세포 내 산성화 (pHi), PI(4,5)P₂, phospholipase C (PLC), protein kinase C (PKC) 등 이 있다(Enyedi et al., 2010; Lesage et al., 2000; Maingret et al., 2000).

대표적으로 TREK 은 세포막 신전 자극에 대하여 민감성을 가진다. 삼투압을 이용하여 세포를 팽창시키거나 Inside-out 패치클램프에서 음압을 주는 등의 세포막을 늘려주는 신전 자극에 대하여 TREK의 활성은 증가한다(Bang et al., 2000; Patel et al., 1998; Maingret et al., 1999; Honore et al., 2006). 신전 자극에 따른 TREK 활성의 증가는 inside-out 패치클램프 조건에서도 나타났다. 이를 통하여 채널 자체 적으로 세포막 신전 자극에 대하여 활성을 증가시키는 기전이 있음을 시사하였다(Bang et al., 2000; Patel et al., 1998; Maingret et al., 1999;

Honore et al., 2006). 신전 자극은 TREK-2 채널의 inner pore와 selectivity filter의 구조를 변형 시킴으로써 채널 활성의 증가를 일으킨다는 것이 3차원 구조 연구를 통하여 밝혀졌다(Aryal et al., 2017). 이러한 inner pore 구조 변화를 통한 TREK의 활성 변화는 M4 부분과 C-말단 초기 부분에 의해서도 조절된다고 알려져 있다 (Honore et al., 2002; Kim et al., 2001; Chemin et al., 2005).

TREK의 추가적인 특성은 온도에 따라 활성이 된다는 것이다 (Maingret et al., 2000). 온도가 섭씨 14도에서 42도로 증가할 때, 채널의 전류는 7 - 20배 정도 증가한다. 다른 K2P 채널에 비하여 매우 높은 온도 민감성을 가지고 있다. TREK은 30도에서 42도 사이에서 가장 높은 활성을 가지며 42도 이상에서는 점차 감소된다. TREK-1의 C-말단을 부분적으로 제거하거나 TASK의 C-말단과 치환하였을 때, TREK-1은 온도 민감성을 잃어 버렸다(Maingret et al., 2000). 이를 통하여 C-말단이 온도 민감성에 따른 채널 활성을 조절하는 부분임을 증명하였다. 세포 부착(cell-attached) 패치클램프 방법이나 whole-cell 패치클램프를 통하여 채널의 활성을 측정하였을 경우에는 온도에 대한 민감성이 확인 되었지만, inside-out 패치클램프 방법을 통하여 측정하였을 때는 온도에 대한 민감성이 측정되지 않았다. 따라서 TREK의 온도에 대한 민감성은 채널의 C-말단뿐만 아니라 추가적인 조절 기전이 있을 것으로 생각된다(Kang et al., 2005).

세 번째로 TREK은 아라키돈산에 의하여 채널의 활성이 5배에서 20배 정도 증가한다(Bang et al., 2000; Lesage et al., 2000; Fink et al., 1998). 포화지방산이나 카복실(carboxyl) 그룹이 하이드록실(hydroxyl) 그룹이나 메틸(methyl) 그룹과 같이 변화된 PUFA 유도체의 경우에는 TREK에 아무런 영향을 주지 못한다(Fink et al., 1998; Maingret et al., 2001). 세포막을 절제하는 excised 패치클램프 방법으로 PUFA에 대한 TREK의 반응성을 측정하였을 경우에도 활성이 증가하였다. 이를 통하여 TREK의 PUFA에 대한 반응성이 C-말단 부

본과 연관되어 있다고 제시되었다(Patel et al., 1998; Kim et al., 2001).

TREK C-말단 부위는 세포 내 산성화, 아라키돈산, phosphorylation 신호, 그리고 $PI(4,5)P_2$ 등의 감지에 매우 중요하다고 알려져 있다(Chemin et al., 2005; Chemin et al., 2007; Murbartian et al., 2005; Patel et al., 1998; Sandoz et al., 2006; Sandoz et al., 2009). 최근 연구에 따르면 C-말단 초기의 신호가 M4 부분과 pore helix 부분을 통하여 C-type gate에 영향을 준다는 보고도 있다(Bagriantsev et al., 2012; Noel et al., 2011).

세포 내 $PI(4,5)P_2$ 의 조절 기전 및 채널 조절

$PI(4,5)P_2$ 는 phosphatidylinositol (PI)의 inositol ring 구조에 phosphate가 추가된 형태이다. PIP_2 는 세포막인지질의 하나로서 세포의 이동, 소포체 순환, 세포원형질막을 경유하는 신호 전달, 수용체와 이온채널들에 대한 조절 등의 역할을 한다. PIP_2 는 PI-kinase에 의한 합성과 lipid phosphatase에 의한 탈인산화, PLC에 의한 가수분해 등에 따라 세포막 농도가 결정된다(De Craene et al, 2017).

PIP_2 의 하나인 $PI(4,5)P_2$ 는 PI 4-kinase (PI4K)에 의해 합성되는 PI 4-phosphate로부터 type I $PI(4)P_5$ -kinase (PIP5K)에 의해 인산화되어 합성된다. Type II PI_5 -phosphatase 4-kinase에 의해 일어나는 $PI(4,5)P_2$ 의 합성은 PIP5K에 의해 일어나는 $PI(4,5)P_2$ 의 합성에 비해 적다. PIP5K는 α , β , γ 세가지 동질이성체(isotype)가 있으며 PI4K 역시 type I (α , β) 과 type II (α , β)가 존재한다. 따라서 PI4K와 PIP5K의 활성은 세포막의 $PI(4,5)P_2$ 농도를 결정하는 주요 변수이며 세포막-세포질 경계에서 일어나는 막 수송 및 신호전달과 밀접히 관련되어 있다. 세포막의 $PI(4,5)P_2$ 는 PLC pathway를 통하여 diacylglycerol (DAG)과 inositol triphosphate (IP_3)로 분해가 되며 신호전달 물질로서의 기능을 담당한다.

세포막 인지질인 $PI(4,5)P_2$ 는 신호 전달 물질로서의 역할 뿐만 아

나라 이온 채널들을 직접 조절한다. Kv 7.2, Kv 7.3, Kir, GIRK, KATP, 그리고 TASK 채널들이 $P(4,5)P_2$ 에 의하여 조절되는 이온 채널로 잘 알려져 있다. 그러한 예의 실험적 증거로서 GPCR 자극을 통하여 $PI(4,5)P_2$ 의 분해를 유도 하였을 때, TREK의 활성화는 감소한다. 반면에 PLC pathway 억제제를 전처리 할 경우 채널의 활성화 감소는 나타나지 않는다. $PI(4,5)P_2$ 에 조절되는 대부분의 이온 채널은 $PI(4,5)P_2$ 에 의하여 활성화가 증가되는 특징이 있다(Mori MX et al., 2014).

$PI(4,5)P_2$ 의 TREK 채널 활성화 조절

TREK은 PUFA 뿐만 아니라 $PI(4,5)P_2$ 또는 phosphatidylserine (PS) 과 같은 세포막 인지질에 의해서도 그 활성화가 조절됨이 알려져 있다 (Chemin et al., 2005; Chemin et al., 2007, Lopes et al., 2005). TREK 활성화 조절의 기전 중 하나로 C-말단과 세포막의 인지질들과의 상호작용이 있다. 세포막에 분포되어 있는 $PI(4,5)P_2$ polar head 와 C-말단의 charged 아미노산들 사이에 정전기적 인력이 작용한다. 정전기적 인력에 의해 C-말단의 구조가 변화되고 채널 활성화가 조절된다(Lesage et al., 2000; Chemin et al., 2007). 특히 TREK-1의 C-말단 306번 글루탐산이 세포막의 $PI(4,5)P_2$ 와 세포 내 산성화에 의한 채널의 활성화 조절에 중요한 아미노산으로 제시되었다(Chemin et al., 2007).

과거 본 연구실에서는 생쥐의 B 세포와 미분화 B 세포주(WEHI-231)에서 TREK-2의 특성을 나타내는 이온 채널을 발견하였다 (Zheng et al., 2009). 그 특성들로 (1) 200 pS 이상의 높은 단일 이온 전도도 (2) 세포 내 산성화에 의하여 채널 활성화 증가 (3) 아라키돈산과 같은 PUFA에 의한 활성화 증가 (4) 세포막 신전 자극에 의한 채널 전류 증가가 확인되었다. TREK-2에 대한 small interfering RNA (siRNA)를 통한 TREK-2 발현 억제 시, 4 가지의 TREK-2 특성을 보이는 K^+ 전류가 기록되지 않았다. 그리고 TREK-2 활성화 측정 초기에

채널의 점진적인 활성 증가가 whole-cell과 inside-out 패치클램프에서 관찰되었다. 점진적으로 증가하는 TREK 활성의 원인으로 세포 내 $PI(4,5)P_2$ 감소를 제시하였다(Nam et al., 2004; Nam et al., 2007; Zheng et al., 2008; Zheng et al., 2009).

그러나 세포 내 $PI(4,5)P_2$ 와 TREK의 활성 조절에 대한 연구들을 살펴보면 TREK-1은 $PI(4,5)P_2$ 에 의해 활성이 증가한다고 알려져 있다. $PI(4,5)P_2$ 에 의해 활성이 조절된다고 알려진 이온 채널들은 활성이 증가하는 방향으로 조절된다. TREK-1과 TREK-2 사이에 $PI(4,5)P_2$ 에 의한 활성 조절에 차이가 있을 수 있다. 그러나 TREK-1과 TREK-2는 아미노산 서열이 60% 이상 유사하며 세포 내 산성화, PUFA, 세포막 신전 자극, 온도 등의 TREK-1에 영향을 미치는 자극들에 대하여 반응성이 있다. 다양한 세포 내 자극들에 의한 TREK의 활성 변화는 채널 C-말단에 의해 조절된다고 알려져 있다. TREK-1과 TREK-2 채널 C-말단의 경우에는 길이는 다르지만 초기 아미노산 서열이 90% 이상 동일하다. 그럼에도 불구하고 TREK-2의 선행연구 결과와는 대조적으로, 다른 그룹들은 $PI(4,5)P_2$ 에 의한 TREK-1의 활성 증가가 제시되어 있다(Chemin et al., 2005; Chemin et al., 2007, Lopes et al., 2005).

$PI(4,5)P_2$ 와 같이 음전하 가지는 물질들과 결합하여 그 효과를 차폐하는 poly-L-lysine (PLL)을 처리한 이후에 $PI(4,5)P_2$ 를 처리하였을 경우에는 채널이 활성화 되었다(Chemin et al., 2005). 그러나 $PI(4,5)P_2$ 에 의한 TREK-1의 활성 조절에 대하여 활성 증가에 대한 주장만이 있는 것은 아니다. 이후 후속 논문에서 PLL 전 처리 없이 $PI(4,5)P_2$ 를 처리하였을 때, $PI(4,5)P_2$ 가 COS-7 세포 및 해마상 신경 세포에서 관찰되는 TREK 전류의 약 절반 가량을 억제했음을 inside-out 패치클램프에서 입증했다(Chemin et al., 2007).

그럼에도 불구하고, 대부분의 다른 연구자들의 관련 연구와 리뷰는 $PI(4,5)P_2$ 를 TREK의 활성 증가 인자로 간주하고 있다(Bista et al.,

2015; Honore et al., 2007; Rivas-Ramirez et al., 2015; Sandoz et al., 2009; Segal-Hayoun et al., 2010). 예를 들어, G Protein-Coupled receptor 자극을 통한 PLC 활성화는 $PI(4,5)P_2$ 가수 분해 효소의 결과로서, *Xenopus* 난모 세포의 TREK 전류를 억제한다(Lopez et al., 2005).

$PI(4,5)P_2$ 의 농도는 PI-kinase에 의해 합성되고 $PI(4,5)$ phosphatase 나 PLC pathway에 의하여 탈인산화되며 균형을 이루고 있다. 따라서 인산화 혹은 탈인산화의 촉진은 TREK의 활성을 변화시킨다. TREK의 활성을 조절하는 $PI(4,5)P_2$ 에 대한 혼란스러운 결과는 $PI(4,5)P_2$ 와 TREK의 관계 및 활성 조절 방향을 명확하게 판단하기 위하여 추가적인 연구가 필요하다.

이 연구에서, ATP와 $PI(4,5)P_2$ 의 효과를 TRKE-2를 HEK293T 및 COS-7 세포에 발현시켜 비교해보고 TREK-1과 TREK-2를 각각 HEK293T 세포에 발현시켜 ATP와 $PI(4,5)P_2$ 가 TREK 활성화에 미치는 효과를 비교해 보았다. 그리고 내재적으로 채널을 발현하고 있는 WEHI-231 세포와 mouse primary astrocyte에서 이를 확인해 보았다.

결과

ATP 제거에 의한 TREK-2 의 자발적인 활성화

HEK293T와 COS-7 세포에 hTREK-2를 발현 유도하고 whole-cell 패치클램프를 통하여 전류를 측정하였다. whole-cell 패치클램프 방법으로 세포막전압을 고정하여 ramp-pulse를 10초에 한번씩 주어 전류/전압 관계 곡선을 기록하였다. - 80 mV의 역전 전위를 가지는 TREK-2 외향 전류가 HEK293T와 COS-7 세포 모두에서 지속적으로 기록되었다.

hTREK-2의 발현을 유도하지 않은 경우에는 HEK293T와 COS-7 세포에서 다른 K^+ 채널의 전류는 기록되지 않았다. hTREK-2의 발현을 유도한 경우에는 whole-cell 패치클램프에서 hTREK-2 전류의 자발적인 증가가 관찰되었으며, 2-3분 가량 지났을 때, 안정적인 전류가 기록되었다. TREK 의 활성화제로 알려진 AA를 10 μ M 처리하였을 때, hTREK-2 전류는 4-5배 정도 증가하였다(Fig. 3 a, c).

미세 유리 전극 내부 용액(피펫 용액)에 ATP 유무를 달리하여 whole-cell 패치클램프로 hTREK-2 전류의 크기를 비교해 보았다. 초기 hTREK-2 전류의 자발적인 증가는 ATP를 포함하지 않은 피펫 용액을 사용한 경우에 ATP를 포함한 피펫용액을 사용한 경우에 비하여 크게 나타났다. 그리고 ATP를 포함하지 않은 피펫 용액을 사용한 경우, AA에 의한 추가적인 전류의 증가가 작게 기록되었다(Fig. 3b, d). 피펫 용액에 ATP가 포함된 경우와 포함되지 않은 경우를 구분하여 막전압 - 40 mV 에서 나타나는 외향 전류 크기를 막대그래프로 정리하였다. 외향 전류의 크기는 AA로 유도한 hTREK-2 최대 전류를 기준으로 상대표준화하여 정리하였다(Fig. 3e). HEK293T와 COS-7 세포에서 ATP 부재시 전류의 증가가 ATP가 포함된 피펫 용액을 사용한 경우보다 크게 관찰되었다.

피펫 용액에 ATP의 유무 여부가 hTREK-2의 다른 특성 중 하나인 온도에 대한 민감성에도 영향을 미치는가에 대하여 실험해 보았다. hTREK-2 전류를 ATP 유무에 따라 26°C 와 37°C 온도

조건에서 각각 기록해 본 결과, hTREK-2 전류는 ATP 유무에 관계없이 온도에 따라 동일한 활성 증가를 나타내었다(Fig. 3f).

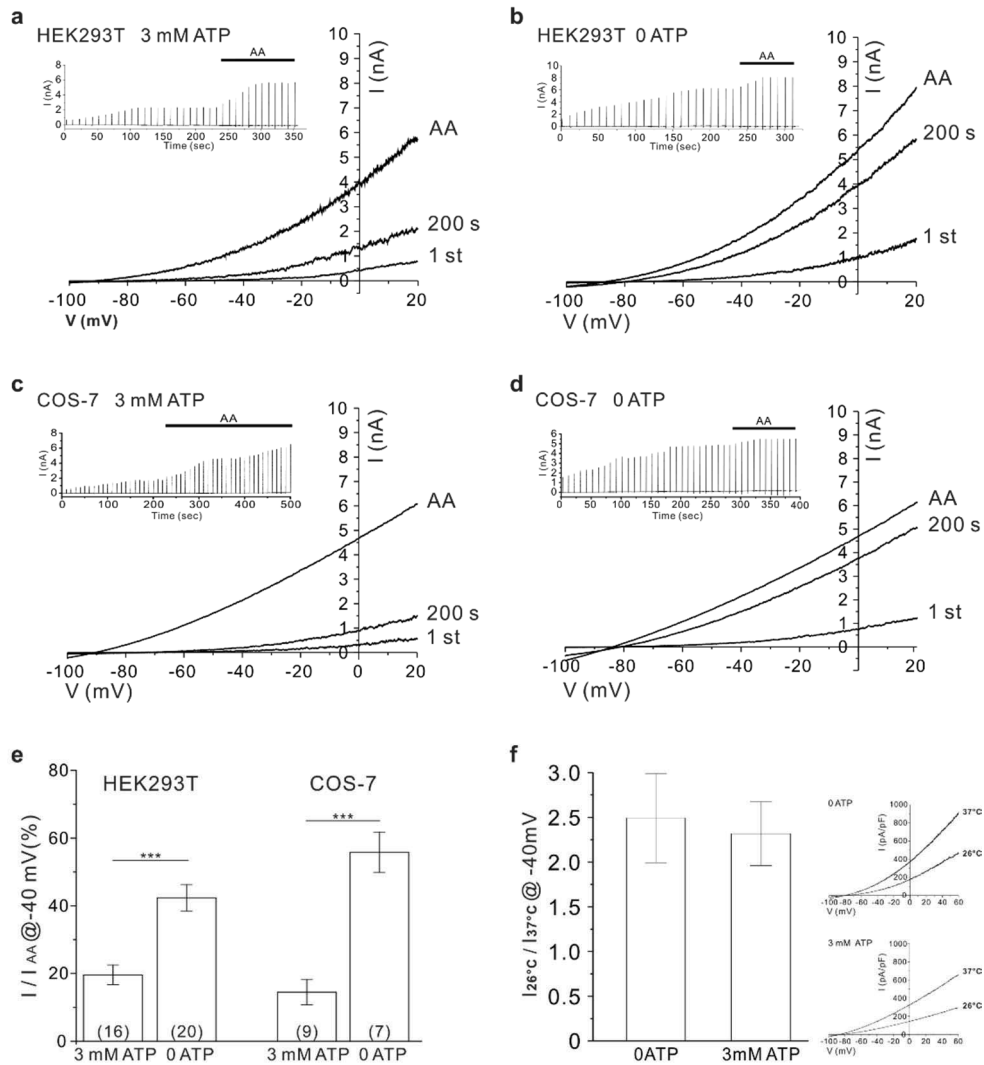


Figure 3. Increase of TREK-2 whole-cell current ($I_{TREK-2, w-c}$) by diluting intracellular ATP

a-d. Representative current-voltage relations (I/V curves) obtained by ramp-like depolarizing pulses of w-c voltage clamp from -100 to 20 mV (0.1 V/s) at every 10 s (holding voltage: -80 mV). Original chart traces of membrane currents are also shown for each test (see inset). Types of cells and the inclusion of ATP in the pipette solution are directly indicated in each panel. After confirming a steady-state in each cell, 10 μ M arachidonic acid (AA) was applied to induce further activation of $I_{TREK-2, w-c}$. **E** Summary of $I_{TREK-2, w-c}$ at 200s after the membrane break-in, normalized to the maximum amplitude

induced by AA in each cell. The differences of steady-state current between ATP-containing and 0 ATP pipette solution are consistently observed in both HEK293T and COS-7 cells (mean \pm SEM). The numbers of tested cells are directly indicated in each bar (n = 16, 20, 7, 7). F. Representative I/V curves of $I_{\text{TREK-2,w-c}}$ in HEK293T cells showing the activation by temperature increase from 26 to 37°C with 0 and 3 mM ATP in the pipette solution (right panels). In the left panel, the temperature-dependent activations are summarized. $I_{\text{TREK-2,w-c}}$ at 37°C is normalized to $I_{\text{TREK-2,w-c}}$ at 26°C in each cell. The number of tested cells is indicated in each bar graph. (***, $P < 0.001$)

패치클램프 기록 초기에 관찰되는 hTREK-2 전류의 증가는 i-o 조건에서, 특히 유리미세전극 말단으로 떼어 진 세포막 안쪽이 ATP 가 없는 KCl 용액에 노출되었을 때 잘 관찰된다. 세포 내 · 외부 용액의 K^+ 농도를 동일하게 하여 inside-out 패치클램프 방법으로 - 60 mV 로 막전압을 고정하여 hTREK-2 전류를 기록하였다. 기록 초기에 자발적으로 증가하는 내향 전류가 관찰되었으며 whole-cell 패치클램프 기록과 비슷하게 2-3 분 이후 전류의 크기가 안정화 되었다(Fig. 4a, b, e). Inside-out 패치클램프 조건에서 내향 전류의 최대 크기는 - 60 mV 기준으로 1-2 nA 에 가깝게 기록되었다.

세포막 안쪽에 3 mM의 ATP를 처리하면 hTREK-2 전류가 신속하게 억제되었으며, 다시 ATP를 세척하면 전류가 나타나는 가역성을 보였다. 이런 반응은 HEK293T와 COS-7 세포에서 모두 관찰되었다(Fig. 4a, b, d). 패치클램프 기록 초기의 hTREK-2 전류의 크기를 안정화된 전류의 크기를 기준 (초기전류 / 안정전류)으로 상대표준화하여 정리해 본 결과, 기록 초기에 관찰되는 hTREK-2 전류의 증가는 COS-7 세포가 HEK293T 세포보다 크게 나타났다. 즉, COS-7 세포에 hTREK-2의 발현을 유도해 기록하였을 때, ATP 가 없는 조건에서 보이는 채널 활성의 증가가 HEK293T 세포에서 보다 더 크게 관찰되었다(Fig. 4c).

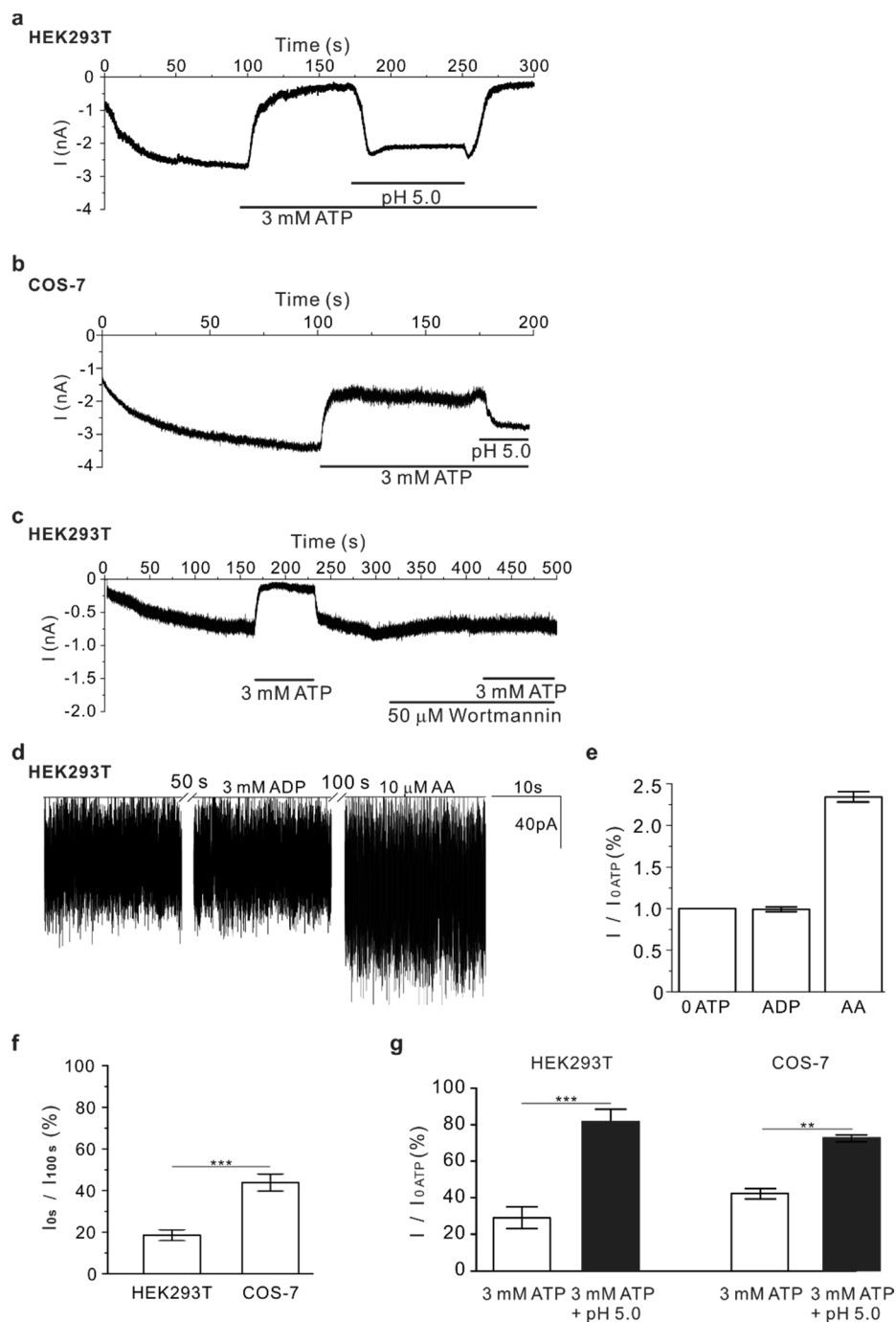


Figure 4. Inhibition of hTREK-2 by applying ATP to the cytoplasmic side of i-o patches

(a, b) After making i-o configuration, spontaneous increase of inward K^+ current ($I_{TREK-2,i-o}$) was consistently observed in both HEK293T and COS-7 cells (holding voltage; -60 mV, symmetrical 140 KCl). After confirming the steady-

state activation, application of 3 mM ATP to the cytoplasmic side inhibited $I_{\text{TREK-2}}$ in both HEK293T and COS-7. **(c)** The inhibition of $I_{\text{TREK-2, i-o}}$ by ATP was prevented by pretreatment with 50 μM wortmannin. **(f)** Summary of the normalized response of $I_{\text{TREK-2, i-o}}$ normalized to the steady-state current (I/I_{OATP} , $n = 5$). **(d, e)** 3 mM ADP had no effect on $I_{\text{TREK-2, i-o}}$. **(f)** Summary of initial current amplitudes at 10 s normalized to the amplitude at 100 s in HEK293T and COS-7 (mean \pm SEM, $n = 17$ and 19 , respectively). The extent of increase was more prominent in HEK293T than COS-7 (***, $P < 0.001$). **(g)** Summary of normalized $I_{\text{TREK-2, i-o}}$ ($I/I_{\text{ATP-free}}$, %) are presented as bar graphs ($n = 10$). With 3 mM ATP, an acidic pH (pHi 5) increased $I_{\text{TREK-2, i-o}}$ in both HEK293T and COS-7 (closed bars). The activation by pHi 5.0 was similarly observed in the absence of ATP (hatched bars).

3 mM ATP를 처리한 조건에서 세포막 안쪽 용액의 pH를 5로 산성화 되도록 낮추어 주었을 때, hTREK-2 전류는 236 % 증가하였다 (Fig. 4a, b, g). 이는 ATP에 의한 hTREK-2의 활성 억제와 세포 내 산성화에 의한 채널의 활성 증가가 독립적으로 나타난다는 것을 의미한다. 세포막 안쪽에 처리한 ATP에 의한 hTREK-2의 억제 반응은 PI-kinase 억제제인 wortmannin을 50 μM 전 처리한 경우 나타나지 않았다 (Fig. 4c). 이는 PI-kinase를 통한 $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ 의 생성이 hTREK-2의 억제 반응을 조절함을 의미한다. Inside-out 패치클램프 방법으로 채널의 전류를 기록하면서 세포막 안쪽에 3 mM의 ATP가 아닌 ADP를 처리하면 억제효과가 관찰되지 않는다. ATP 처리시 관찰되는 채널 억제는 ATP나 ADP에 의한 직접적인 억제 반응은 아니다 (Fig. 4d).

PI(4,5)P₂에 의한 hTREK-2 억제 및 poly - L -lysine에 의한 비선택적 가림 효과

Inside-out 패치클램프 기록 조건에서 세포막 안쪽으로 10 μM 의 $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ 를 처리하였을 때, HEK293T와 COS-7세포에 발현된 hTREK-2 전류는 완벽하게 억제되었다. 몇몇 경우 높은 저항(7–8 M Ω)을 가지는 피펫으로 전류를 기록한 경우에는 단일 채널 전류가

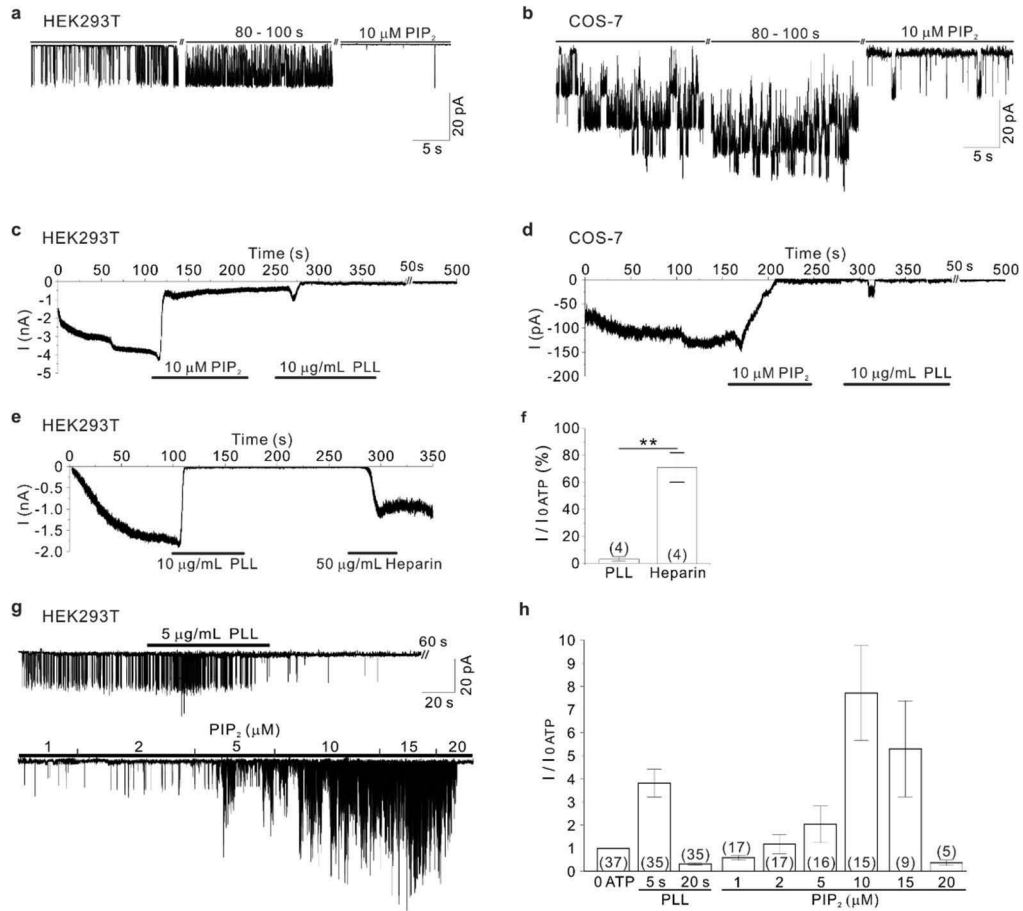


Figure 5. Suppression of $I_{TREK-2, i-o}$ by $PI(4,5)P_2$ application

(a-e) Representative current traces under i-o conditions at -60 mV with symmetrical KCl solutions. The current traces showing unitary TREK-2 activities (a, b) or macroscopic $I_{TREK-2, i-o}$ (c, d) were commonly suppressed by 10 μM $PI(4,5)P_2$, which was not reversed by washout. (c, d) The subsequent application of PLL (10 $\mu g/mL$) partly recovered $I_{TREK-2, i-o}$ only transiently. (e, f) The spontaneously increased $I_{TREK-2, i-o}$ was totally suppressed by PLL, which was reversed by applying heparin (50 $\mu g/mL$) (**, $P < 0.01$). (g, h) After confirming the sustained inhibition by PLL, application of $PI(4,5)P_2$ with increasing concentrations (1- 20 μM) induced initial activation and inhibition of $I_{TREK-2, i-o}$.

측정 되었으며 hTREK-2의 특성인 높은 전도도가 관찰되었다. 단일 채널이 기록되었을 경우에도 기록 초기의 자발적인 활성 증가와 $PI(4,5)P_2$ 에 의한 TREK 억제가 확인되었다(Fig. 5a, b).

특이하게도 ATP에 의한 채널의 억제에는 가역적인 반면에 PI(4,5)P₂에 의한 억제는 세척에도 불구하고 잘 회복되지 않았다(Fig. 5c, d). TREK과 PI(4,5)P₂의 polyanionic inositol head 사이에 정전기적 인력이 작용하여 채널의 활성을 조절할 것으로 가정하였다. 음전하성 PI(4,5)P₂의 효과를 강력히 상쇄할 수 있는 polycationic agent 인 PLL을 세포막 안쪽에 10 µg/mL 처리해 보았다. PLL 처리가 채널 억제를 회복시킬 것이라는 예상과는 다르게 PLL를 처리하더라도 일시적이고 부분적인 활성 복구만 보였다 (Fig. 5c, d). 또한 PI(4,5)P₂의 전 처리 없이 PLL를 세포막 안쪽에 직접 처리한 경우에도 hTREK-2 전류는 억제되었다 (Fig. 5e). PLL의 강력한 hTREK-2 억제 효과는 일반적인 세척으로는 회복되지 않았으나 polyanionic agent인 heparin을 50 µg/mL 처리해준 경우에 억제효과가 사라졌다(Fig. 5e, f).

처리 순서를 달리 하여, Inside-out 패치클램프 기록에서 PLL 처리로 hTREK-2 전류를 억제한 다음 PI(4,5)P₂ 농도를 점차 높이며 처리하였다. 상대적으로 낮은 농도 PI(4,5)P₂는 TREK 전류를 증가시켰으나, 15 µM 이상의 PI(4,5)P₂를 처리한 경우에는 전류가 다시 억제되었다(Fig. 5g, h).

ATP와 PI(4,5)P₂에 의한 TREK-1 활성 억제

Human TREK-1을 HEK293T 세포에 발현을 유도하여 ATP와 PI(4,5)P₂에 대한 채널 활성 변화를 조사하였다. Whole-cell 패치클램프 방법으로 hTREK-1 전류를 측정하였다. 피펫 용액의 ATP의 유무에 따라 기록되는 전류의 크기가 상이했다. ATP가 피펫 용액에 없는 경우, ATP가 포함된 피펫 용액으로 실험하였을 때 보다 whole-cell 패치클램프 기록 초기에 보이는 전류의 증가가 크게 나타났다(Fig. 6a-c). ATP 유무에 의한 hTREK-1 활성 차이는 hTREK-2에서도 동일하게 관찰되었다.

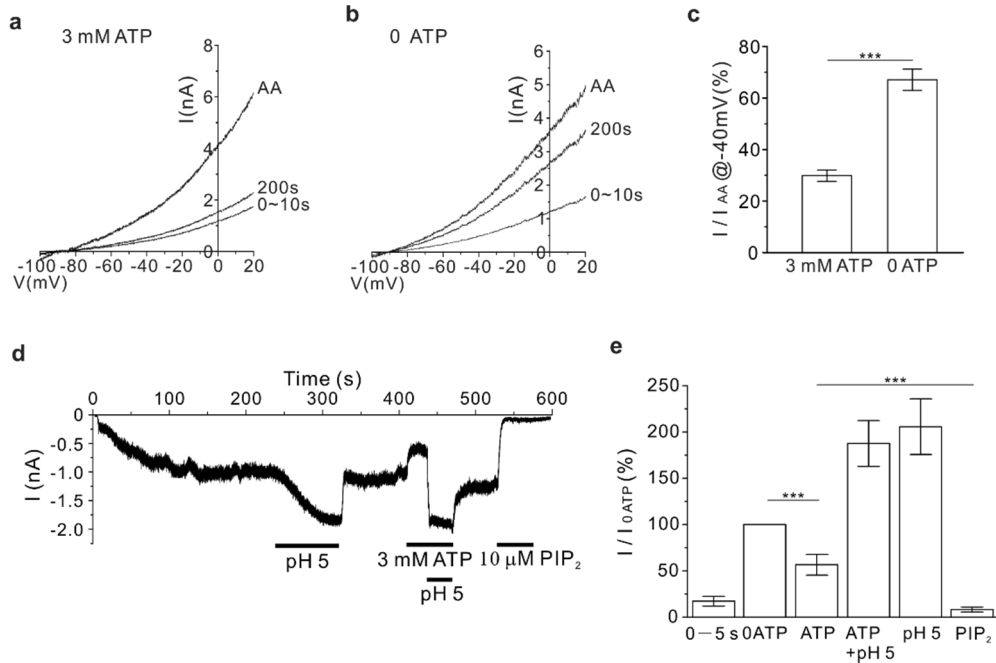


Figure 6. Inhibition of TREK-1 by intracellular ATP and PI(4,5)P₂ application
(a, b) Representative I/V curves of TREK-1 overexpressed in HEK293T cells showing differential tendency of spontaneous activation depending on intracellular ATP. **(c)** Summary of I_{TREK-1,w-c} at 200 s after the membrane break-in with or without intracellular ATP, normalized to the maximum amplitude induced by 10 μM AA (mean ± SEM, n = 6 and 6, respectively). **(d, e)** Representative current trace of I_{TREK-1,i-o} and summary of normalized currents (n = 20) showing spontaneous activation after membrane excision and inhibition by ATP. Additional activation by acidic pH_i (5.0) and total inhibition by PI(4,5)P₂ are also shown. (***, P < 0.001).

Inside-out 패치클램프 방법으로 세포막전압을 - 60 mV로 고정하여 hTREK-1 전류를 기록하였다. 세포 내 산성 용액(pH 5.0)은 채널 활성의 증가를 ATP 유무에 관계없이 유도했다. 그리고 세포막 안쪽에 처리한 10 μM PI(4,5)P₂는 hTREK-1 전류를 모두 억제하였다. 3 mM ATP를 세포막 안쪽에 처리하였을 때, ATP 처리 전에 비하여 전류가 50% 정도 감소하였다(Fig. 6d, e). 세포 내 산성화에 의한 채널 활성의 증가는 ATP 유무와 관계없이 일정했다.

PI(4,5)P₂의 탈인산화 및 가수분해에 의한 TREK-2 활성 조절

ATP 부재 시 나타나는 TREK 활성의 자발적인 증가는 PI(4,5)P₂의 탈인산화로 인한 결과로 추론된다. 세포 내 환경을 유지한 채로 PI(4,5)P₂의 탈인산화를 유도하기 위하여 voltage sensitive phosphatase (Dr-VSP)를 사용하였다. 세포막의 탈분극을 인식하여 활성화되는 Dr-VSP를 hTREK-2와 함께 HEK293T 세포에 발현시켰다. 세포막전압을 - 80 mV로 고정하여 Dr-VSP가 활성화 되지 않도록 유지하였으며, Dr-VSP의 활성을 유도할 때는 세포막전압을 20 mV로 고정하여 PI(4,5)P₂의 지속적인 탈인산화를 유도했다. 전류/전압 관계 곡선을 기록하기 위하여 일정 기울기 전압 변화 자극 (ramp-pulse)(from - 100 to 60 mV, 500 ms)을 10 초 간격으로 주었으며 탈분극 이전, 탈분극 초기, 그리고 탈분극 말기의 ramp-pulse를 각각 기록하여 비교하였다.

세포에 hTREK-2 만을 발현시킨 경우에는 지속적인 탈분극에도 전류/전압 관계 곡선의 변화가 없었다(Fig. 7c). 반면에 Dr-VSP와 hTREK-2를 세포에 함께 발현시킨 경우에는 탈분극 초기에 전류가 2배 가까이 증가하였다. 그리고 지속된 탈분극에는 탈분극 전에 비하여 hTREK-2 활성이 감소했다(Fig. 7a-c).

생리학적인 방법으로 세포 내 PI(4,5)P₂를 감소시키는 또 다른 방법은 G-protein coupled receptor (GPCR) 자극을 통한 PLC 경로 활성을 일으켜 PI(4,5)P₂를 DAG와 IP₃로 분해하는 것이다. G-protein coupled receptor 중 하나인 type 3 muscarinic receptor (M3)를 HEK293T 세포에 hTREK-2와 함께 발현시킨 후, carbachol (CCh, 1 μ M)을 처리하여 PI(4,5)P₂의 분해를 유도하였다. hTREK-2 전류는 일시적인 증가 이후에 41% 감소하였다(Fig. 7d-f).

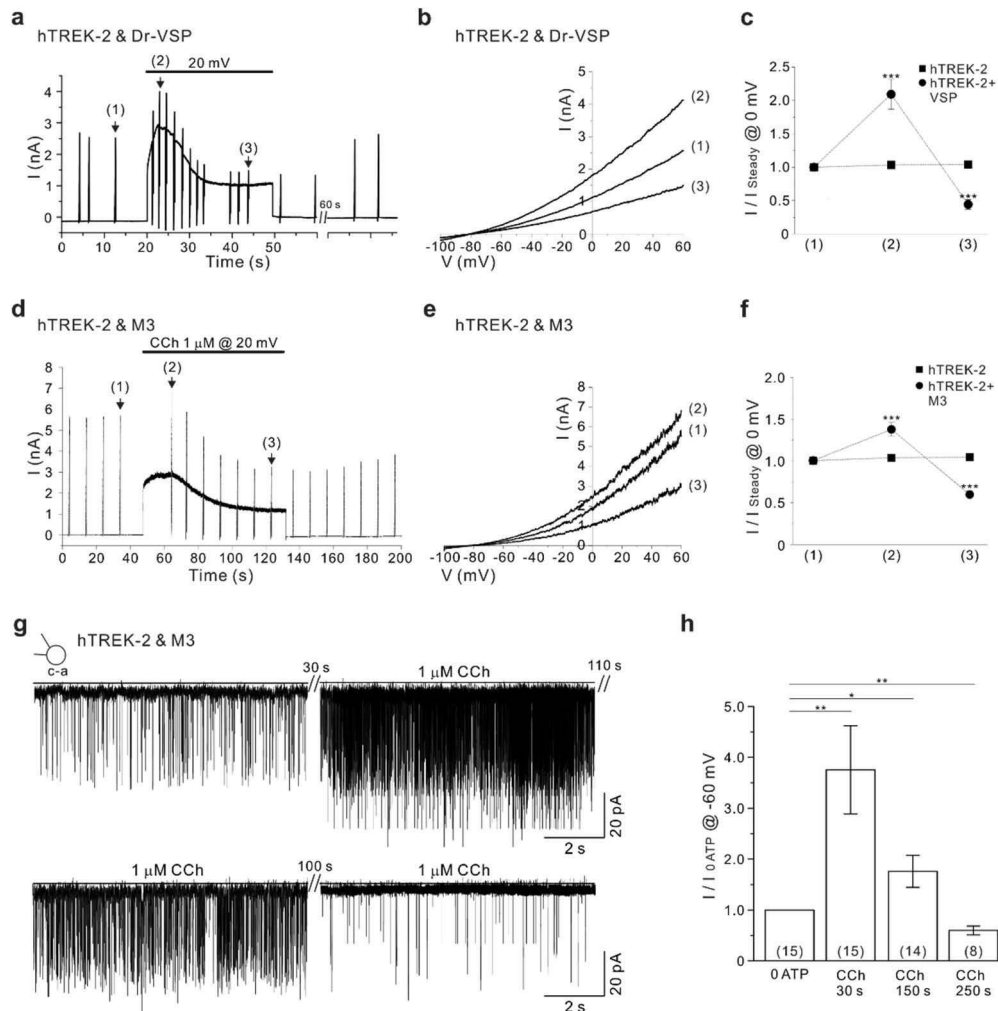


Figure 7. Dual effects of Dr-VSP and M3 muscarinic receptor activation on hTREK-2

(a, b) A representative trace of currents and I/V curves in response to ramp pulses (from -100 to 60 mV, 0.1 V/s) and sustained depolarization to 20 mV in HEK293T cells co-transfected with TREK-2 and Dr-VSP. (c) Summary of normalized $I_{TREK-2,w-c}$ at 0 mV before (1), initial peak (2) and sustained (3) depolarization to 20 mV. [n = 8 and 8 for TREK-2/Dr-VSP (circle) or TREK-2 alone (square), respectively]. (d, e) A representative trace of current and I/V curves in response to CCh (1 mM) in HEK293T cells co-transfected with TREK-2 and M3 muscarinic receptor. During CCh application, sustained depolarization to 20 mV was also applied to continuously monitor the change of $I_{TREK-2,w-c}$. (f) Summary of normalized $I_{TREK-2,w-c}$ at 0 mV before (1), 10s (2) and 80s (3) of CCh application [n = 11 and 9 for TREK-2/M3(circle) or TREK-2 alone(square), respectively]. (g) A representative trace of $I_{TREK-2,c-a}$ at -60 mV

showing initial (0-30s) activation by 1 μ M CCh (upper traces), followed by inhibition during the sustained application of CCh (lower traces). **(h)** Summary of the normalized $I_{TREK-2, C-a}$ ($I/I_{ATP-free}$) at different times after CCh application. The data are shown as the mean \pm SEM. (***, $P < 0.001$; **, $P < 0.01$; *, $P < 0.05$).

Kang 등의 발표(2006)에 따르면 TREK-2는 PKC 활성화를 통해서도 억제된다.

M3 수용체 자극은 PLC 경로를 통하여 $PI(4,5)P_2$ 를 분해하고 DAG를 생성하여 PKC 경로를 활성화시킨다. 이러한 선행 연구를 바탕으로 PKC 활성이 억제된 상태에서 CCh 자극이 TREK-2 활성을 조절하는지 확인하였다. PKC 억제제인 GO6976 (100 nM) 과 GF109263X (1 μ M) 를 2 분 가량 처리 후, M3 receptor를 CCh을 처리하여 자극하였다. CCh에 의한 TREK 활성 감소는 PKC 억제 상태에서 여전히 나타났다. 흥미롭게도 cell-attached 패치클램프 방법으로 hTREK-2 전류를 측정하였을 때, hTREK-2 전류는 CCh 처리 초기 (30s)에 처리 전에 비하여 3.7배 증가가 관찰되었고, 지속적인 (>200s) CCh 자극에 전류의 감소가 나타났다(Fig. 7g, h). PLC 경로를 통한 $PI(4,5)P_2$ 감소를 유도하였을 때, hTREK-2 활성이 증가하였다가 감소한다. hTREK-2의 기본적인 활성은 낮은 활성 상태로 유지되고 있으며 $PI(4,5)P_2$ 의 감소에 따라 활성이 변화한다.

성상교세포와 미분화 B 림프구에서 관찰되는 TREK-2 전류의 ATP와 $PI(4,5)P_2$ 에 의한 활성 조절

뇌의 성상교세포에는 TREK-1과 TREK-2 채널이 발현되어 있다고 알려져 있다(Gnatenco et al., 2002; Hwang et al., 2014). 생후 1-2일 된 생쥐에서 성상교세포를 분리하여 1주 가량 배양하였다. Whole-cell 패치클램프를 통해 성상교세포의 K^+ 전류를 측정하였다. ATP가 포함된 피펫 용액 사용하여 기록하였을 때, 기록 초기 관찰되는 자발적으로 증가하는 전압 비의존성 K^+ 전류가 ATP가 포함되지 않은 피펫 용액을 사용한 경우보다 작게 기록되었다. AA를 처리하여 TREK

의 최대 활성을 유도 하였을 때, 추가적인 활성 증가 반응이 ATP 가 포함된 피펫 용액을 사용한 경우에 더 크게 기록되었다(Fig. 8a, b).

2가 양이온이 포함되지 않은 용액조건에서 inside-out 패치클램프 방법으로 K^+ 채널 전류를 측정하였다. 성상교세포에서 단일 기울기 전도도가 TREK-2와 유사한 312 pS인 K^+ 채널이 기록되었다. hTREK-2와 유사한 K^+ 전류는 10 μ M PI(4,5) P_2 처리에 의하여 완전히 억제되었다(Fig. 8c, d). Inside-out 패치클램프 방법으로 TREK-2 유사 전류 측정 시, ATP에 의한 활성 억제를 관찰하였다. PI-kinase 억제제인 wortmannin 처리로 ATP에 의한 채널 활성 억제가 나타나지 않았다($n = 3$; Fig. 8e). 따라서 성상교세포에서도 PI(4,5) P_2 의존적인 TREK 활성 억제 반응을 확인 하였다.

비록 생쥐의 B 림프구에서 기록되는 TREK-2 전류가 ATP와 PI(4,5) P_2 에 억제된다는 보고가 있으나, 성상교세포에서 관찰되는 TREK 활성과의 비교를 위하여 기록해보았다. WEHI-231과 성상교세포 모두에서 TREK-2 전류는 10 μ M PI(4,5) P_2 처리에 억제되었다. 그러나 ATP에 의한 TREK-2 억제효과는 성상교세포에 비하여 WEHI-231 세포에서 더 크게 관찰되었다 (Fig. 8f-i). Inside-out 패치클램프 형성 초기에 관찰되는 자발적인 TREK-2 전류의 증가 또한 성상교세포 보다 WEHI-231 세포에서 크게 나타났다. TREK-2 의 활성을 비교하기 위한 지표로서 초기 TREK-2 활성(NPo of 0-20 s) 과 안정상태의 TREK-2 활성(NPo of 100-120 s)을 분석하였다. 이를 통하여 TREK-2 활성이 WEHI-231 세포와 비교하여 성상교세포에서 높게 유지되고 있다는 것을 알 수 있다(Fig. 8j).

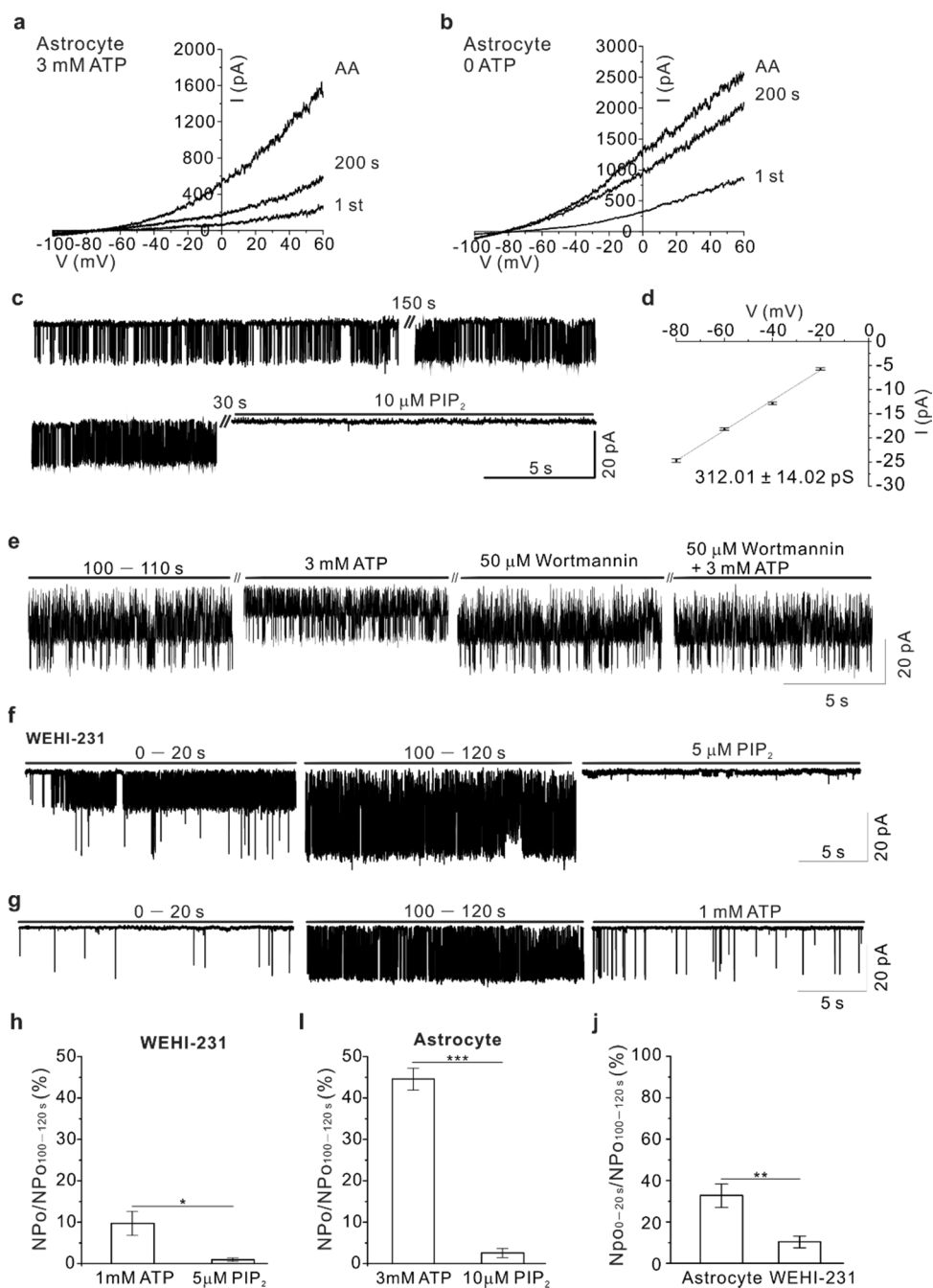


Figure 8. Inhibition of TREK-2 by ATP and PI(4,5)P₂ in mouse astrocytes and WEHI-231 B lymphocytes

(a, b) Representative traces of w-c I/V curves obtained in the mouse primary astrocytes with or without intracellular ATP. The steady-state amplitude of outward current was higher in the ATP-free than 3 mM ATP-containing condition. (c) A representative trace of astrocyte I_{TREK-2,i-o} at -60 mV with

symmetrical KCl conditions showing spontaneous activation (upper) and complete inhibition of TREK-2 like channels by PI(4,5)P₂ (lower). **(d)** The unitary slope conductance of PI(4,5)P₂-sensitive K⁺ channels in astrocytes was 312 pS (n = 13). **(e)** Partial inhibition of I_{TREK-2,i-o} by 3 mM ATP in mouse astrocytes, which was prevented by wortmannin. **(f, g)** Representative traces of I_{TREK-2,i-o} in WEHI-231 B lymphocytes showing prominent spontaneous activation by making i-o configuration, and potent inhibition by PI(4,5)P₂ (f) and ATP (g). **(h, i)** Summary of the changes in i-o I_{TREK-2} by ATP and PI(4,5)P₂ in WEHI-231 and astrocytes. Note that the inhibition by ATP is less significant in astrocytes than WEHI-231. **(j)** The ratio of initial TREK-2 activity over steady-state level (0-20 s/100-120 s) was higher in astrocytes than WEHI-231. (***, *P*<0.001; **, *P*<0.01; *, *P*<0.05).

PI(4,5)P₂ 의존적인 TREK 채널의 활성 조절 가상 모델

TREK-1과 TREK-2의 활성 상태를 살펴보면 TREK은 낮은 활성 상태를 나타내고 있으며 특정 조건이나 자극을 통해 활성이 증가된다. TREK 활성을 조절하는 인자들 가운데, PI(4,5)P₂는 TREK을 억제한다. 세포막 PI(4,5)P₂와 같은 음전하 물질들의 생성과 감소는 TREK 활성 변화를 조절한다. TREK의 C-말단에는 PI(4,5)P₂ 인식 부분이 있을 것으로 생각되며 C-말단과 PI(4,5)P₂의 관계를 실험결과를 바탕으로 간략한 그림으로 표현해 보았다(Fig. 9).

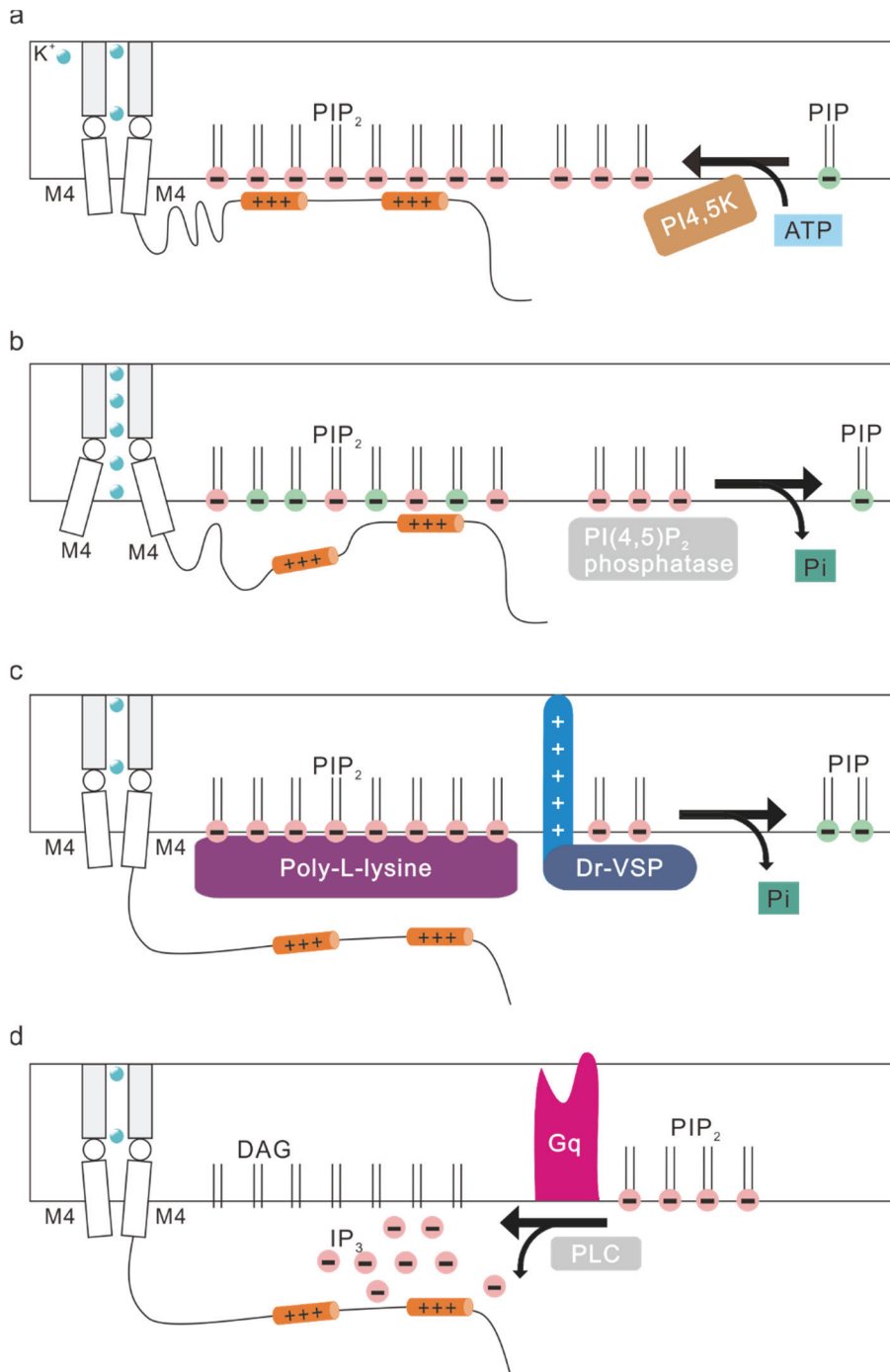


Figure 9. Hypothetical models of PI(4,5)P₂ and ATP-dependent regulation of TREK-2

(a) Under physiological resting state, the intrinsic generation of PI(4,5)P₂ by kinases (PI4K and PI5K) inhibits TREK-2. **(b)** In ATP-free condition, spontaneous decay of PI(4,5)P₂ to a moderate level by intrinsic mechanisms

(e.g. lipid phosphatase) releases TREK-2 from the tonic inhibited state. (c) Exogenous application of charge screening agent (PLL) or forced dephosphorylation of PI(4,5)P₂ by sustained activation of Dr-VSP drives TREK-2 into inhibited state. (d) General hydrolysis of PI(4,5)P₂ by M3 stimulation removing the negatively charged IP3 also shifts TREK-2 into the inhibited state. PI(4,5)P₂ is colored by red and PI(4 or 5)P is colored by green.

TREK C-말단 양전하 아미노산의 TREK 활성 조절

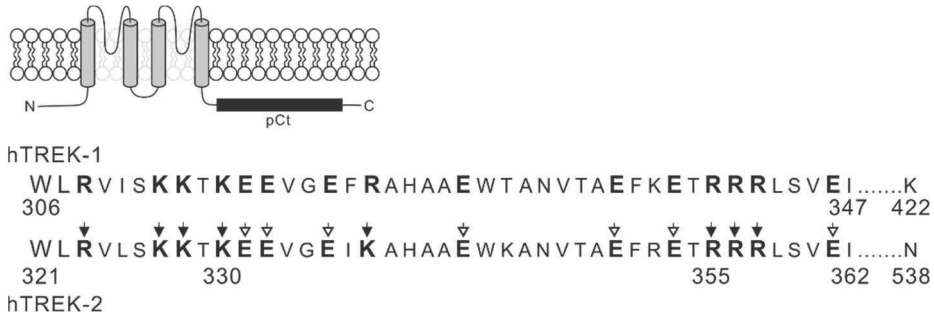


Figure 10. Sequence alignment of proximal C-terminal (pCt) domains in hTREK-1 and hTREK-2

In the above panel, a schematic drawing of the TREKs topology is shown with the pCt marked with a black bar. The lower panel shows aligned pCt sequences of hTREK-1 (from 306 to 347) and hTREK-2 (from 321 to 362). The pCt domain of hTREK channel family has cationic and anionic amino acids cluster. The mutated amino acids in the pCt are indicated by open and closed arrow heads for the negatively charged amino acids and the positively charged amino acids, respectively.

TREK 활성화는 크게 extracellular side / intracellular side pore 주위 구조 변화와 신전 자극으로 야기되는 pore 부분의 구조 변화로 인해 조절된다고 알려져 있다. 그 가운데 TREK C-말단에 존재하는 charged 아미노산들과 세포막 안쪽의 막지질들과의 정전기적 상호작용을 통한 채널 활성 조절 기전이 있다(Chemin et al., 2007; Honore et al., 2002; Kim et al., 2001). C-말단 근위부에 존재하는 양전하성 아미노산[알지닌(Arg, R), 라이신(Lys, K)]은 323 번에서 363 번 아미노산 사이에 8개(323, 327, 328, 330, 337, 355, 356, 357)가 있다(Fig. 10,

검정 화살표로 표시). 알지닌(Arg, R) 및 라이신(Lys, K)을 선택적 변형(point mutation)을 통하여 각각 알라닌(Ala, A)으로 치환하여 양전하의 효과를 제거해 주었다. 각각의 돌연변이는 HEK293T 세포에 발현을 유도하였으며, inside-out 패치클램프를 통하여 세포 내부와 외부의 KCl 농도를 동일하게 맞추어 실험을 진행하였다. 세포막전압은 -60 mV 로 고정하여 그에 따른 전류를 기록 하였다.

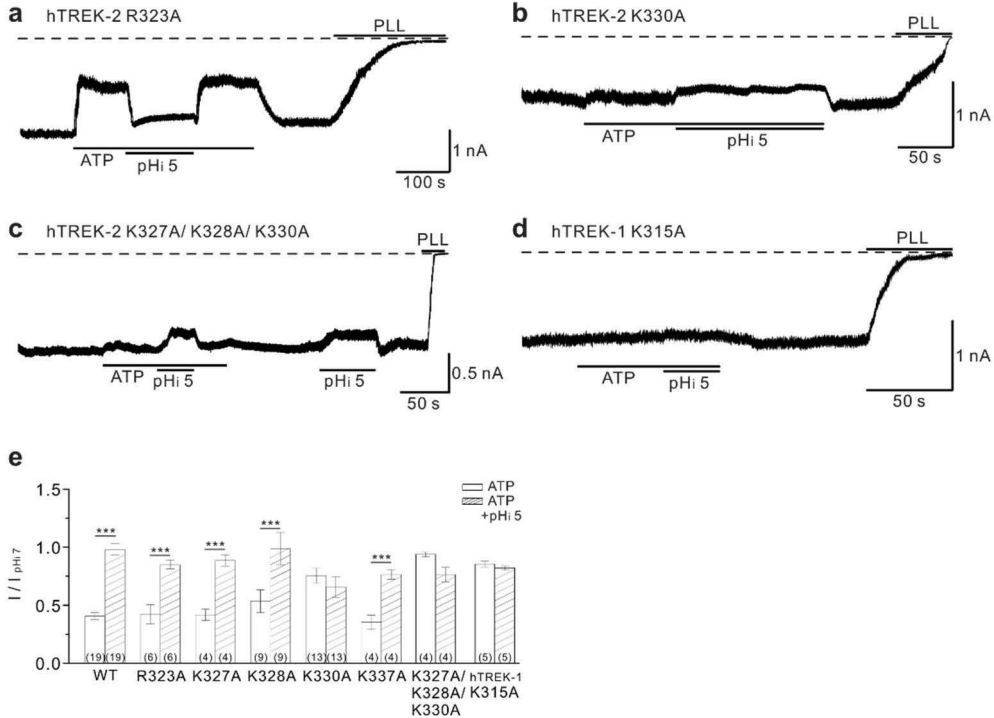


Figure 11. Responses of hTREK-2, i-o and hTREK-1, i-o to acidic pH with ATP in cationic residue neutralizing mutants of hTREK-2 and hTREK-1.

(a) A representative case of R323A hTREK-2, i-o showing inhibition by ATP and activation by pH 5. (b,d) Insignificant effects of ATP and slight inhibition by acidic pH 5 in hTREK-2, i-o of K330A and hTREK-1, i-o of K315A. (c) K327A/K328A/K330A triple mutations of hTREK-2 also showed resistance to ATP and slight inhibition by acidic pH similar to K330A. (e) Summary of the hTREK-2, i-o inhibition by ATP and activation by pH 5 normalized to the current at pH 7.0 measured in the WT and six mutants of hTREK-2 neutralizing the cationic residues in pCt. The summary of hTREK-1 K315A is also shown. (***, $P < 0.001$).

PI(4,5)P₂의 머리부분(inositol ring)은 음전하를 가지며 C-말단의 양전하 아미노산들과 정전기적 상호작용을 한다. 정전기적 상호작용은

TREK C-말단의 구조 변화를 야기하여 활성을 조절한다. 그러나 TREK C-말단에 대한 연구는 특정 음전하 아미노산(E332)과 C-말단 초기 아미노산들의 중요성만이 알려져 있었다. 먼저, E332 주변 5 개의 양전하 아미노산들(R323, K327, K328, K330, K337)을 각각 알라닌으로 치환하여 inside-out 패치클램프 방법으로 세포 내 환경 조건을 조절하며 TREK-2 전류를 측정하였다.

hTREK-2 K330A 돌연변이를 제외한 4개의 돌연변이(R323, K327, K328, K337)는 ATP 에 의한 활성 억제와 세포 내 산성화(pHi 5.0)에 의한 활성 증가가 야생형과 동일하게 나타났다(Fig. 11a, e). K330A 돌연변이는 야생형에 비해 ATP 에 의한 활성 억제가 감소했고 세포 내 산성화에 따른 활성 증가가 나타나지 않았다. 오히려 세포 내 pH 5.0 에 의해 활성이 약하게 감소했다(Fig. 11b, e).

K330 과 주위에 존재하는 양전하 아미노산이 ATP 처리에 따른 TREK 활성 변화에 중요하다고 생각되었다. 그래서 K330, K327, K328 을 함께 알라닌으로 치환하여 C-말단 초기 부분의 양전하 효과를 더욱 줄여보았다. hTREK-2 K327A/ K328A/ K330A는 K330A와 같이 ATP에 의한 채널 활성 억제가 감소하였고 세포 내 산성화에 따른 활성 증가가 나타나지 않았다. 그리고 ATP 유무에 관계없이 세포 내 산성화에 의해 활성이 감소되었다 (Fig. 11c, e). hTREK-2의 K330에 해당하는 hTREK-1의 K315 를 알라닌으로 치환하여 채널 활성을 측정해 보았다. hTREK-1 K315A는 ATP를 세포막 안쪽에 처리하여도 채널 활성이 감소하지 않았고 세포 내 산성화에도 채널 활성이 증가하지 않았다(Fig. 11d, e).

hTREK-2 K330A는 세포 내 산성화에 따른 활성 증가 반응이 사라졌다. 세포 내 산성화 이외의 추가적인 활성 증가 조건에 대한 K330A 돌연변이의 반응을 확인해 보았다. hTREK-2 K330A의 아라키돈산(AA)과 2-APB에 대한 반응을 whole-cell 패치클램프를 통해 기록하였다. 10 μ M 아라키돈산과 100 μ M 2-APB에 TREK-2 외향 전류

는 각각 70.3 % 그리고 66.3 % 증가했다(Fig. 12a, c). 반면에 K330A 는 아라키돈산과 2-APB에 의한 활성 증가가 야생형에 비하여 크게 감소하였다(Fig. 12b, c). 아라키돈산과 2-APB 처리에도 추가적인 활성 증가가 나타나지 않은 것은 채널 활성이 최대 활성 상태에 가깝게 증가되어 있는 것으로 생각된다.

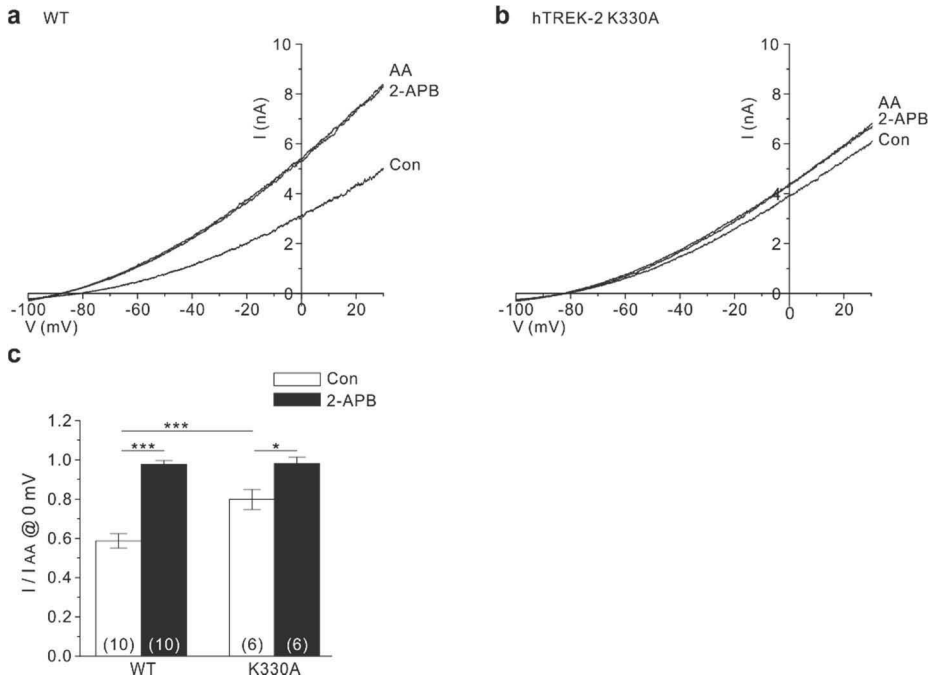


Figure 12. Whole-cell patch clamp studies comparing the effects of 2-APB on the ATP- and acidic pHi-resistant mutants of hTREK-2.

Under the whole-cell patch clamp condition (3 mM ATP in the pipette solution), current-voltage relations (I/V curves) were obtained by ramp-like depolarizing pulses from -100 to 30 mV (pulse duration, 500 ms; holding voltage, -80 mV) at every 10 s. 10 μ M 2-APB was applied before confirming the full activation of $I_{TREK-2, w-c}$ by arachidonic acid(AA). **(a)** WT hTREK-2 showed nearly full activation by 10 μ M 2-APB close to the AA-induced activation. **(b)** K330A showed less significant activation by 2-APB than WT. **(c)** Summary of $I_{TREK-2, w-c}$ at 0 mV normalized to the maximum amplitude induced by 10 μ M AA in each cell (mean \pm SEM). the number of tested cells are directly indicated in each bar. (***, $P < 0.001$; **, $P < 0.01$; *, $P < 0.05$).

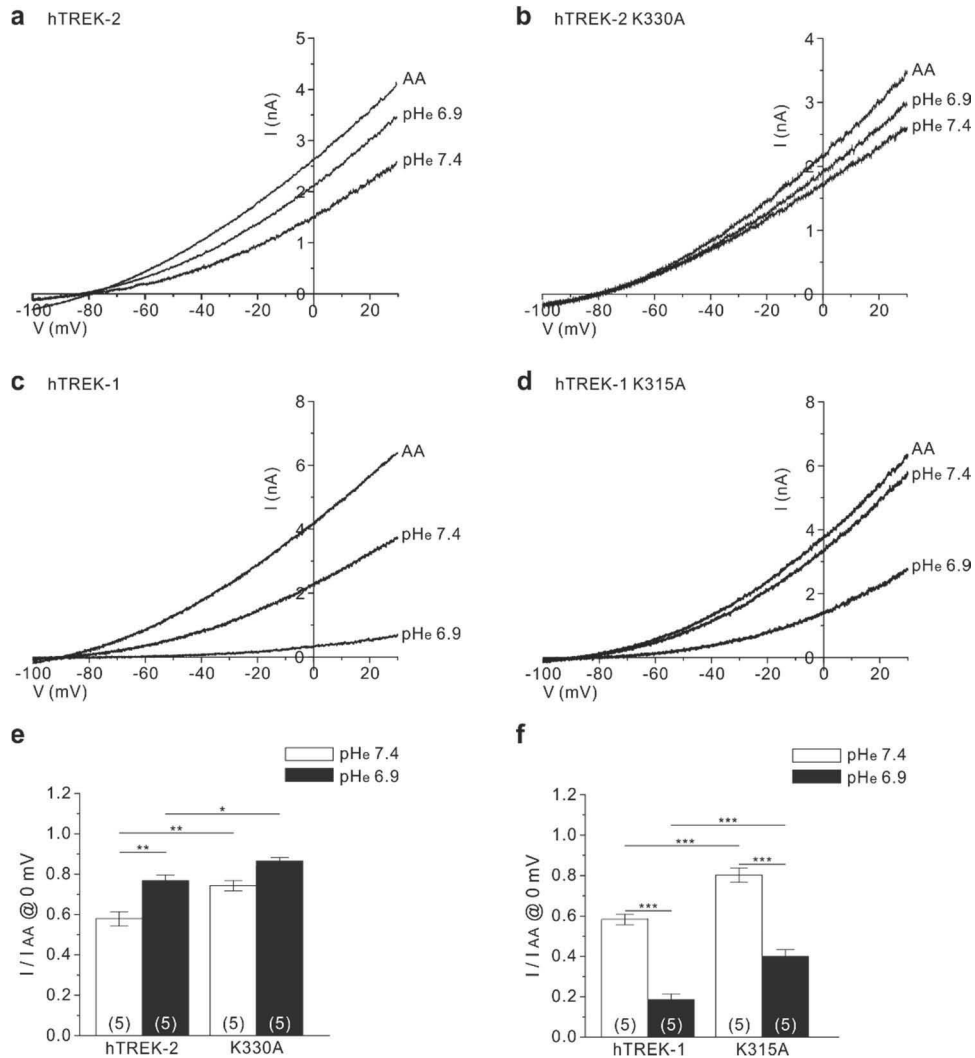


Figure 13. Whole-cell patch clamp studies comparing the effects of pH on the ATP- and acidic pH-resistant mutants of hTREK-2.

Under the whole-cell patch clamp condition (3 mM ATP in the pipette solution), current-voltage relations (I/V curves) were obtained by ramp-like depolarizing pulses from -100 to 30 mV (pulse duration, 500 ms; holding voltage, -80 mV) at every 10 s. pH_e 6.9 was applied before confirming the full activation of $I_{\text{TREK-2,w-c}}$ by arachidonic acid(AA). **(a)** $I_{\text{TREK-2,w-c}}$ of hTREK-2 activated by pH_e 6.9 . **(b)** K330A showed less activation by pH_e 6.9 than WT. **(c)** $I_{\text{TREK-1,w-c}}$ of hTREK-1 inhibited by pH_e 6.9 . **(d)** $I_{\text{TREK-1,w-c}}$ of K315A hTREK-1 inhibited by pH_e 6.9 . **(e,f)** Summary of $I_{\text{TREK-2,w-c}}$ and $I_{\text{TREK-1,w-c}}$ at 0 mV normalized to 10 μM AA-induced current (mean \pm SEM). the numbers of tested cells are indicated in each bar(***, $P < 0.001$; **, $P < 0.01$; *, $P < 0.05$).

TREK-2는 세포 밖 용액의 산성화에 의해 활성이 증가되고

TREK-1은 활성이 감소하는 서로 다른 특성을 가지고 있다(Sandoz et al., 2009). hTREK-2는 세포 밖 용액의 pH를 7.4에서 6.5로 바꾸어 주었을 때, hTREK-2 외향 전류는 36% 가량 증가했다(Fig. 13a). hTREK-2 K330A는 야생형에 비하여 세포 밖 산성화(pHe 6.5)에 따른 활성 증가가 유의성 있게 감소하였다(Fig. 13b, e). 세포 밖 산성화(pHe 6.5)로 야기되는 활성 억제 반응을 hTREK-1 야생형과 K315A 돌연변이에서 비교해 보았다. 세포 밖 산성화(pHe 6.5)는 야생형과 K315A 돌연변이의 활성을 모두 억제했다. 세포 밖 용액 산성화(pHe 7.4 to 6.5) 조건에 의해 억제된 전류를 10 μ M 아라키돈산으로 유도한 hTREK-1 최대 전류를 기준으로 상대표준화하여 정리하였다. 야생형은 39.6%, K315A는 43.2% 감소하였다(Fig. 13c, d, f).

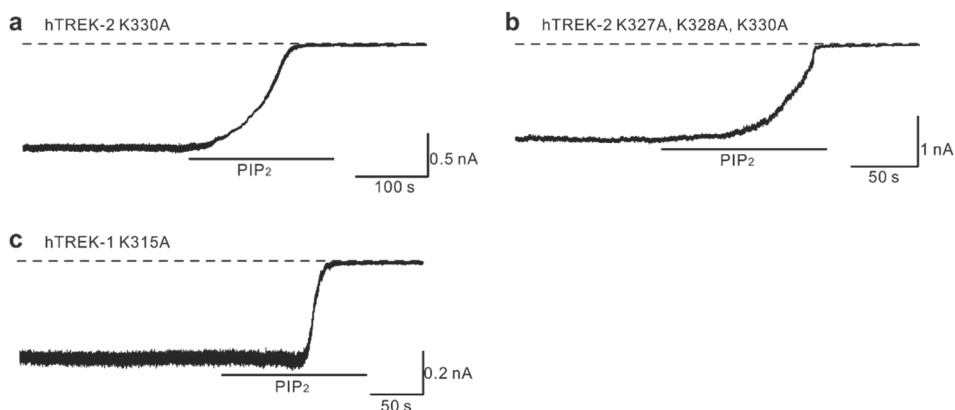


Figure 14. Indiscriminate inhibition of ATP-resistant cationic amino acid mutants by exogenous PI(4,5)P₂.

(a-c) Representative traces of hTREK-2 mutants (K330A and K327A/ K328A/ K330A) and hTREK-1 mutant (K315A) showing the abolishment of I_{TREK-2,i-o} and I_{TREK-1,i-o} on application of 10 μ M PI(4,5)P₂.

TREK-2 K330A에서 관찰되는 증가된 활성 상태는 PI(4,5)P₂와의 상호작용이 사라져 일어나는 현상으로 생각되었다. 이를 확인하기 위해 PI(4,5)P₂를 세포 내측에 직접적으로 처리하여 TREK-2 K330A의 활성 변화를 관찰하였다(Fig. 14). Inside-out 패치클램프를 통하여 세포막 안쪽에 10 μ M PI(4,5)P₂를 처리하였다. 직접적으로 세포막 안쪽

에 처리한 PI(4,5)P₂는 TREK-2 전류를 억제했다(Fig. 5). hTREK-2 K330A와 hTREK-1 K315A는 직접적인 10 μ M PI(4,5)P₂ 처리에 대하여 야생형과 동일하게 채널의 활성이 억제 되었다(Fig. 14).

TREK-1 C-말단의 서열과 TREK-2 C-말단의 서열을 살펴보면 M4 부분에서 C-말단으로 이어지는 근위부 이외에도 양전하 아미노산인 알지닌(Arg)이 연속적으로 존재하는 부분이 두 곳(355-7번, 377-9번) 존재한다. 두 곳의 연속적인 알지닌 또한 PI(4,5)P₂와 정전기적 상호작용을 하는지 확인해 보기 위하여 3개의 연속되는 알지닌을 알라닌으로 치환하여 whole-cell 패치 클램프와 inside-out 패치클램프를 통하여 채널의 활성을 기록하였다(Fig. 15).

두 곳의 연속된 알지닌 가운데 hTREK-2 R355-7A는 매우 낮은 활성 상태를 보였으며 ATP에 대한 반응성은 나타나지 않았다. 그러나 신전자극이나 세포 내 산성화에 활성이 크게 증가하였다(Fig. 15 a). hTREK-2 R355-7A에 상응하는 hTREK-1 R340-2A의 경우에도 낮은 활성과 채널 활성을 증가시키는 자극들에 대한 큰 반응성을 보였다(Fig. 15 b). Whole-cell 패치클램프를 통하여 hTREK-2 R355-7A와 hTREK-2 R377-9A의 활성을 측정해 본 결과, hTREK-2 R355-7A는 활성이 낮아 외향 전류의 크기가 작았다. 전류의 크기는 10 μ M AA를 처리하여 유도한 TREK의 최대 활성을 기준으로 상대표준화하여 정리하였다. hTREK-2 R355-7A는 야생형에 비교하여 매우 낮은 활성 상태를 나타냈다(Fig. 15 e, f). 반면에 hTREK-2 R377-9A의 활성 상태는 야생형과 차이가 없었으며 inside-out 패치클램프에서 관찰된 ATP와 세포 내 산성화에 대한 반응 또한 야생형과 차이가 없었다(Fig. 15 c, d, f).

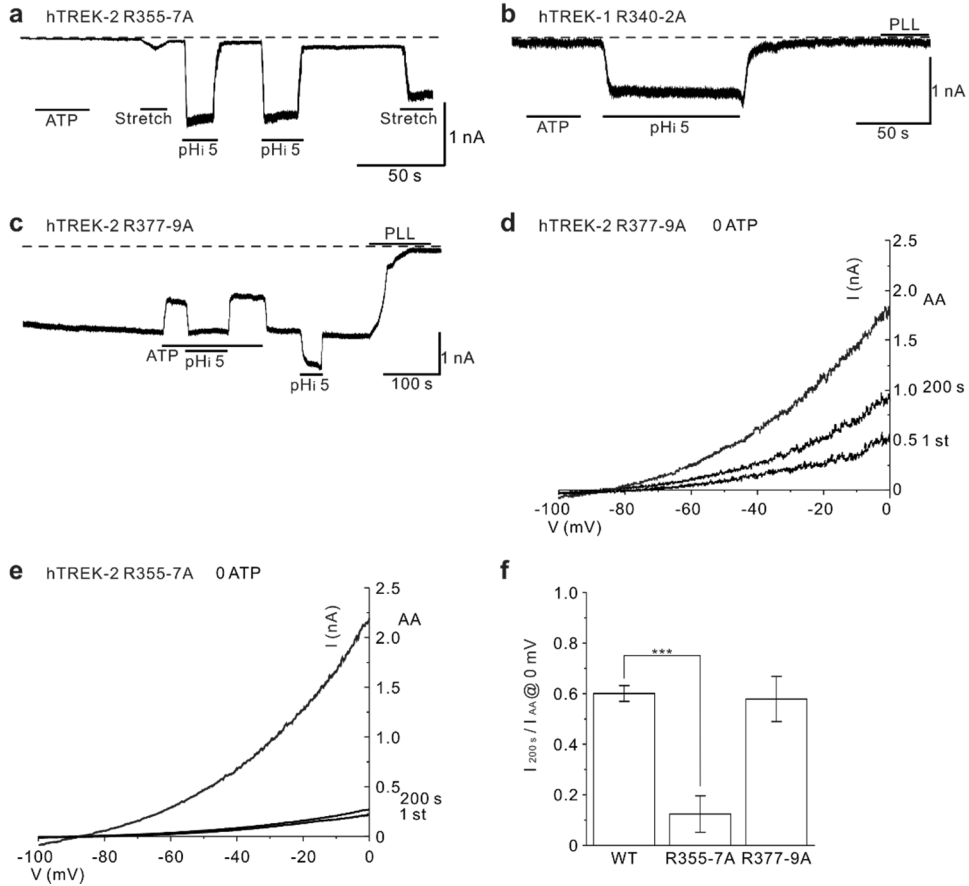


Figure 15. Responses of ITREK-2, i-o and ITREK-1, i-o to acidic pH with ATP and ITREK-2, w-c on the triple arginine mutants.

(a) A representative case of R355-7A ITREK-2,i-o showing low activity, no inhibition by ATP and activation by pH 5. (b) A trace of R340-2A ITREK-1,i-o showing low activity, no inhibition by ATP and activation by pH 5. (c) A trace of R377-9A ITREK-2, i-o showing inhibition by ATP and activation by pH 5. (d) ITREK-2, w-c of R377-9A showed activation by AA. (e) ITREK-2,w-c of R355-7A hTREK-2 more activated by AA than WT. (f) Summary of ITREK-2,w-c at 0 mV normalized to 10 μM AA-induced current (mean ± SEM). (***, $P < 0.001$).

앞서 ATP에 의한 TREK 활성 억제는 PI-kinase를 통한 PI(4,5)P₂ 합성과 관계가 있음을 확인하였다. hTREK-2 K330A는 활성이 매우 높고 ATP 처리시 나타나는 활성 억제가 감소했다. 반면에 hTREK-2 R355-7A는 hTREK-2 K330A와 반대로 낮은 활성 상태와 활성제에 따른 추가적인 활성 증가가 크게 나타났다. hTREK-2 활성을 변화시

키는 K330과 R355-7를 모두 알라닌으로 치환하여 활성 상태와 활성 자극에 대한 반응을 관찰하였다. hTREK-2 K330A / R355-7A는 inside-out 패치클램프에서 낮은 채널의 활성이 관찰되었고 세포 내 산성화에 대한 추가 활성 증가가 크게 나타났다. hTREK-2 K330A / R355-7A의 세포막 안쪽에 처리한 ATP와 산성화 따른 채널 활성 변화가 hTREK-2 R355-7A와 유사했다 (Fig. 16 a). hTREK-2 K330A / R355-7A의 낮은 활성은 whole-cell 패치클램프를 통하여 한번 더 확인 하였다(Fig. 16 b).

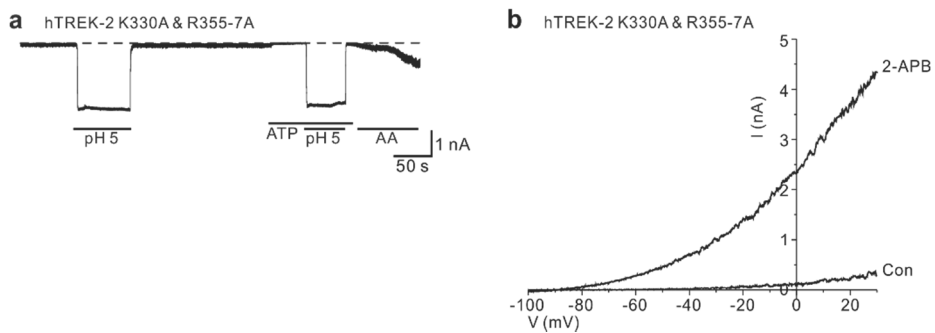


Figure 16. Responses of K330A/R355-7A hTREK-2, i-o to acidic pH with ATP and K330A/R355-7A hTREK-2, w-c to 2-APB.

(a) A representative case of K330A / R355-7A hTREK-2, i-o showing low activity, no inhibition by ATP and activation by pH 5. **(b)** hTREK-2, w-c of K330A / R355-7A hTREK-2 showed less activity and activated by 2-APB. (3 mM ATP in the pipette solution)

고찰

ATP 부재에 따른 TREK 채널의 활성화 반응

세포 내 ATP 부재는 PI-kinase를 통한 $PI(4,5)P_2$ 합성을 저해한다. 그리고 지속적으로 일어나는 $PI(4,5)P_2$ 의 탈인산화와 분해는 TREK의 자발적인 활성화를 야기한다. 피펫 용액에 ATP가 포함되어 있을 경우에도 작지만 TREK 전류의 자발적인 증가가 whole-cell 패치클램프에서 관찰된다. Matsuda 연구 그룹에 따르면 whole-cell 패치클램프 형성 시 cytoplasmic peripheral membrane protein 인 ezrin 과 microtubule-associated protein 2 (Mtap2)에 의하여 세포막으로 수송되는 TREK이 증가한다. 따라서 세포막에 발현되는 채널이 증가하여 전류가 증가 한다고 설명 하였다(Andharia et al., 2017).

Inside-out 패치클램프를 통해 기록된 hTREK-1과 hTREK-2의 전류 크기는 whole-cell 패치클램프를 통해 기록한 전류의 크기를 바탕으로 예상한 크기보다 매우 크다. 예를 들어, 세포막전압을 -60 mV로 고정하였을 때 기록되는 전류의 크기는 -2 nA 정도 였는데, whole-cell 패치클램프로 기록한 TREK-2 전류의 최대 크기는 20 mV에서 약 6–8 nA 이다. Inside-out 패치클램프 방법을 통해 기록되는 세포막의 크기는 약 $1\ \mu\text{m}$ 미만이다. HEK293T 세포의 지름은 20–30 μm 정도로 알려져 있다(Thomas et al., 2004). Whole-cell에서 기록하는 세포막의 면적과 inside-out에서 기록하는 세포막의 면적을 비교하면 400 배정도 차이가 난다. Inside-out을 통하여 기록하는 세포막은 세포막 전체의 매우 일부분이다. Whole-cell 패치클램프를 통해 TREK 활성을 기록할 경우, TREK은 일정부분 억제된 상태로 있는 것으로 생각된다.

물론 Inside-out 패치클램프 방법으로 기록할 때 TREK 전류가 크게 나타나는 원인이 세포막에 가해지는 물리적인 자극이나 밝혀지지 않은 채널 활성 조절 인자 때문일 가능성도 있다. 세포 구조단백질인

cytoskeleton이 화학적 혹은 물리적으로 변화되었을 때 TREK-1의 활성이 증가한다는 발표도 있다(Lauritzen et al., 2005). 이렇듯 TREK은 다양한 자극들에 의해 민감하게 활성이 조절된다. 따라서 TREK의 활성을 조절하는 물질이나 그 원리를 연구할 때는 실험 조건을 잘 계획해야 한다.

PI(4,5)P₂에 의한 TREK의 낮은 채널 활성 유지

본 연구자는 실험을 통하여 다양한 세포에서 TREK-2 활성이 PI(4,5)P₂와 ATP에 의하여 억제되는 것을 확인했다. 그리고 TREK-1의 활성도 PI(4,5)P₂와 ATP에 의해 억제되었다. TREK-2에서 보이는 ATP에 의한 채널 활성의 억제는 ATP-dependent PI-kinase에 의해 생성된 세포막 PI(4,5)P₂에 의한 결과라는 보고가 있다(Zheng et al., 2009). ATP 처리에 따른 TREK 활성 억제는 PI-kinase 억제제인 wortmannin 전처리 시 나타나지 않았다. 실험 결과와 문헌들의 정보를 종합해 보면 세포 내 ATP는 PI-kinase를 활성화하여 PI(4,5)P₂의 생성을 유도한다. 따라서, ATP에 의해 생성되는 PI(4,5)P₂는 TREK-1과 TREK-2의 활성을 억제한다. PI-kinase와 phosphatase를 통한 PI(4,5)P₂ 조절은 TREK 활성을 조절한다. 세포 내 ATP를 공급하지 않을 경우 관찰되는 TREK 활성 증가는 ATP 부족에 따라 세포막에 존재하는 PI(4,5)P₂의 탈인산화 반응이 인산화 반응에 비해 과도하게 일어나 PI(4,5)P₂에 의해 낮게 유지되고 있던 TREK의 활성이 증가하는 것이다.

WEHI-231 세포에서 성상교세포보다 ATP에 따른 억제 반응이 크게 나타나는 것(Fig. 8h, I)은 세포에 따른 PI-kinase 활성의 차이로 생각된다. 또한 hTREK-2 발현을 유도한 HEK293T와 COS-7 세포에서 관찰된 ATP에 따른 억제 반응의 차이(Fig. 4a-d) 또한 세포 간의 PI-kinase 활성의 차이로 생각된다. 그리고 PI-kinase 활성 차이는 세포막을 절제하여 TREK 전류를 측정하는 경우(I_{TREK,i-o})에도 나타날

수 있을 것으로 예상된다.

세포 막전압을 낮게 유지하는데 중요한 TREK 의 세포 내 활성 상태는 활성제를 처리하여 유도한 최대 활성을 기준으로 낮게 유지되고 있으며 낮은 활성은 $PI(4,5)P_2$ 와 관련되어 있다. 그러나 $PI(4,5)P_2$ 처리시 관찰되는 hTREK-2 억제 효과는 $PI(4,5)P_2$ 에 의한 TREK-1 활성 증가를 주장한 다른 연구 논문들(Chemin et al., 2005; Lopes et al., 2005; Lopes et al., 2007)과 상충된다. $PI(4,5)P_2$ 에 의한 TREK 활성의 증가를 확인한 논문들(Chemin et al., 2005)은 PLL를 처리하여 TREK 활성 억제를 확인한 이후에 $PI(4,5)P_2$ 에 대한 TREK 활성 변화를 관찰하였다. PLL의 비선택적인 세포막 음전하 물질과의 결합은 생리학적 으로 세포막에 존재하는 $PI(4,5)P_2$ 와도 결합하여 $PI(4,5)P_2$ 의 TREK 활성 조절을 차단한다. TREK 의 활성에 영향을 줄 수 있는 $PI(4,5)P_2$ 이외의 음전하 인지질 또한 PLL 처리에 의해 그 효과가 차단된다 (Fig. 7c). 따라서 PLL 전 처리 후 기록된 $PI(4,5)P_2$ 에 따른 채널 활성 변화는 해석에 주의해야 한다.

세포막 내측에 존재하는 $PI(4,5)P_2$ 에 의해 활성이 조절되는 채널들의 조절 기전을 살펴보면, $PI(4,5)P_2$ 결합 부위로 알려진 Pleckstrin homology (PH) domains을 채널이 가지고 있거나 pore 부분 주위의 세포질 방향으로 존재하는 C-말단에서 전하를 가지는 아미노산들이 $PI(4,5)P_2$ 와 정전기적 상호작용을 통하여 채널의 활성을 조절한다. TREK 의 아미노산 서열을 살펴보면 PH domain 이 존재하지 않는다. 따라서 C-말단에 의해 TREK 활성이 조절될 것으로 생각 되었다.

분자단위에서 생각해보면 TREK 의 초기 C-말단 양전하 아미노산과 $PI(4,5)P_2$ 와 같은 인지질 사이의 정전기적 상호작용에 의해 채널 활성이 조절된다(Chemin et al., 2007; Sandoz et al., 2011). 낮은 농도의 $PI(4,5)P_2$ 를 처리한 조건에서는 TREK C-말단에 존재하는 채널 활성과 관계된 부분이 세포막의 음전하와 강력한 상호작용을 이루며 TREK 활성을 증가시킨다. 세포막 $PI(4,5)P_2$ 분포가 높아지면 C-말단

의 또다른 양전하 부분이 PI(4,5)P₂와 약한 상호작용 이루며 채널을 억제하는 역할을 한다고 생각된다. 따라서, 생리적인 세포막 PI(4,5)P₂는 TREK 활성을 낮게 유지하는 정도로 존재하고 있으며 ATP 또는 PI(4,5)P₂의 추가적인 공급에 채널 활성이 억제된다(Fig. 7a, b). Dr-VSP를 이용하여 세포막 PI(4,5)P₂의 탈인산화를 야기하였을 때 관찰되는 hTREK-2 전류의 양방향적인 변화는 PI(4,5)P₂ 농도에 따른 TREK 활성 변화 때문이다(Fig. 5a-c). hTREK-2 활성 증가가 약하게 기록되었으나, CCh로 자극한 M3 수용체의 활성화에 따라 나타나는 hTREK-2 활성의 증가 후 억제되는 반응은 PI(4,5)P₂ 농도에 따른 양방향적인 TREK 활성 조절의 간접적 증거이다(Fig. 5d-f).

TREK C-말단과 PI(4, 5)P₂ 의존적 TREK 의 활성 조절

먼저 TREK-1의 초기 C-말단이 세포 내 산성화, phospholipid, phosphorylation, membrane stretch, 온도, 그리고 마취제 등을 감지하는 역할을 한다고 여러 논문을 통해 발표된 바 있다(Chemin et al., 2005; Honore et al., 2002; Murbartian et al., 2005; Noel et al., 2011; Patel et al., 1998; Patel et al., 1999). 또한 C-말단 부위가 A-kinase anchoring protein 150 과 연관되어 있다는 발표도 있다(Sandoz et al., 2006). C-말단 부분의 정확한 구조가 밝혀져 있지 않아 명확한 기전을 설명하기는 어렵지만 C-말단 부분은 세포막과 매우 가깝게 위치하고 있거나 붙어 있다고 생각된다. 그래서 C-말단의 세포막으로의 위치 변화가 transmembrane helix를 움직여서 채널 활성을 조절 한다고 주장되어 왔다(Bagriantsev et al., 2011, 2012; McClenaghan et al., 2016; Piechotta et al., 2011; Renigunta et al., 2015; Sandoz et al., 2011). 그러나 하나의 글루탐산만으로 C-말단에 의한 TREK 활성 조절을 통합적으로 설명하기에 한계가 있다.

점 변이를 통하여 TREK C-말단의 양전하 아미노산을 알라닌으로 치환하여 채널 활성과 ATP에 대한 반응을 확인했다. 양전하를 가지는

330번 라이신(Lys, K)과 355번, 356번 357번 알지닌(Arg, R)의 역할을 새롭게 발견하였다. hTREK-2 330번 라이신은 세포 내 산성도 감지와 ATP에 의해 유도되는 $PI(4,5)P_2$ 의존적 TREK 활성의 억제에 중요하다. hTREK-1 K315A와 hTREK-2 K330A의 세포 내 산성도에 대한 반응성의 감소는 쉽게 해석되지 않는다. 라이신의 전하나 pKa를 고려해 보았을 때, 라이신은 세포 내 산성화에 의해 쉽게 영향을 받지 않는다. Whole-cell 패치클램프를 통해 기록한 hTREK-2 K330A의 활성은 야생형에 비하여 높게 유지되어 있었다(Fig. 12). hTREK-2 K330A의 높은 활성은 330번 라이신이 ATP-dependent PI-kinase에 의해 생성된 세포막 $PI(4,5)P_2$ 와 정전기적 상호작용을 하지 못하여 채널 억제가 경감된 것으로 생각된다(Fig. 17 e). hTREK-2 330번 라이신의 중요성은 hTREK-2 330번 라이신 위치에 상응하는 hTREK-1 315번 라이신을 점 변이를 통하여 전하가 없는 알라닌으로 치환 하였을 때, hTREK-1 K315A의 활성이 높게 유지되고 있었으며 활성제에도 추가적인 활성 증가가 보이지 않았다. 또한 inside-out 패치클램프를 통한 세포 내 ATP 처리에도 활성에 변화가 없었다(Fig. 11). 이를 통하여 TREK C-말단의 라이신(hTREK-1 K315, hTREK-2 K330)이 $PI(4,5)P_2$ 와 정전기적 상호작용하며 TREK 활성의 억제에 중요함을 제시하였다.

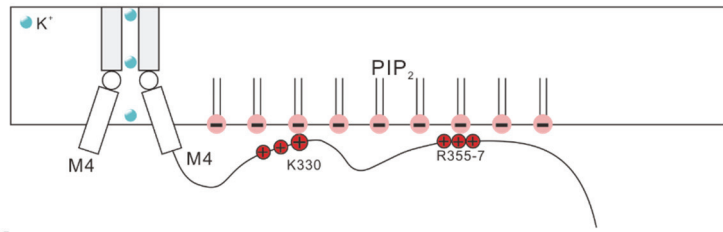
hTREK-2 K330뿐만 아니라 $PI(4,5)P_2$ 와 정전기적 상호작용을 하며 채널의 활성을 조절하는 355번, 356번, 357번의 연속되는 알지닌의 역할을 확인 하였다. K330이 $PI(4,5)P_2$ 의존적 hTREK-2 활성을 억제하는 부분이었다면 R355-7은 $PI(4,5)P_2$ 의존적으로 hTREK-2의 기본적인 활성을 유지해 주는 부분이다. R355-7를 점 변이를 통하여 알라닌으로 치환한 hTREK-2를 제작하여 실험한 결과, whole-cell 패치클램프와 inside-out 패치클램프 모두에서 hTREK-2 R355-7A는 매우 낮은 활성 상태를 보였다. Whole-cell 패치클램프를 통하여 활성을 측정 한 경우에 세포 내측 용액에 ATP가 없음에도 불구하고 활성이 매

우 낮았다(Fig. 15). hTREK-2 R355-7A는 기본적으로 낮은 활성에도 불구하고 TREK-2 활성 증가 자극으로 알려진 세포 내 산성화나 아라키돈산(AA)에 대해서 매우 큰 활성 증가를 보였다. 이는 R355-7 부분의 알라닌 치환으로 인하여 hTREK-2 활성을 유지해주는 기전에 문제가 생긴 것으로 추측 할 수 있다. R355-7 부분이 PI(4,5)P₂와 정전기적 상호작용을 통하여 결합하며 C-말단의 구조를 채널 활성 증가 방향으로 유지하는 역할을 한다는 것을 제시하였다(Fig. 17 d).

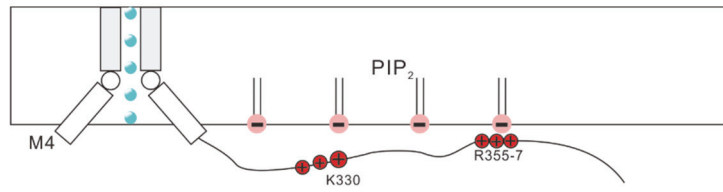
PI(4,5)P₂와의 정전기적 상호작용을 통한 hTREK-2의 활성 조절 부분으로 생각되는 K330과 R355, R356, R357 아미노산은 각각 서로 반대되는 방향으로 채널의 활성을 조절한다. K330은 채널 활성을 억제하는 역할을 하고 R355-7은 채널의 기본적인 활성을 유지하는 역할을 한다. 다른 역할을 하는 K330과 R355-7을 모두 알라닌으로 치환하여 hTREK-2의 활성 및 자극들에 대한 반응을 살펴보았다. PI(4, 5)P₂와 연관된 두 부분의 아미노산을 모두 치환한 결과, 채널의 활성은 매우 낮았으며 낮은 채널 활성으로 인하여 ATP에 의한 채널 억제가 관찰되지 않았다(Fig. 14). 이는 K330 부분과 R355-7 부분이 PI(4, 5)P₂와 정전기적 상호작용을 하지 못하면 PI(4, 5)P₂ 의존적 채널의 활성 자체가 유지되지 않아 채널의 활성이 매우 낮은 것으로 고려된다(Fig. 17 f).

TREK C-말단 부분의 정확한 구조가 밝혀져 있지 않아 명확한 C-말단의 조절 기전을 설명하기 어렵지만 실험결과를 바탕으로 C-말단에 의한 TREK 조절 기전을 간략한 그림으로 표현해 보았다(Fig. 17).

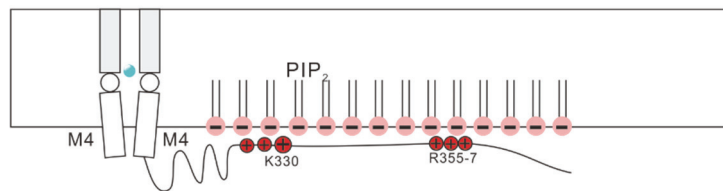
a WT



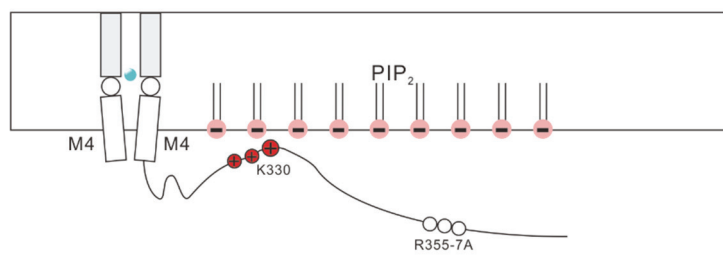
b Low PI(4,5)P₂



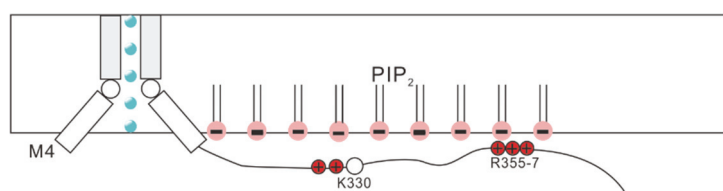
c High PI(4,5)P₂



d R355-7A



e K330A



f K330&R355-7A

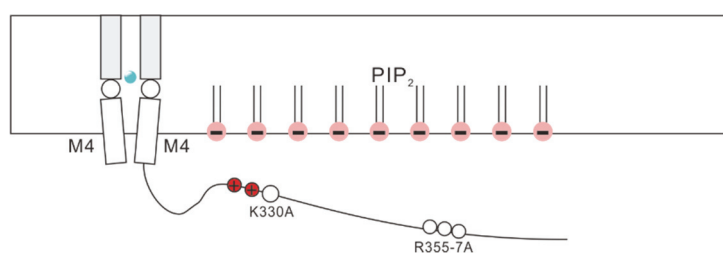


Figure 17. Cartoon summary of TREK-2 gating regulated by interaction between pCt Lys330, Arg355–7 and PI(4,5)P₂.

Schematic drawing of TREK-2 dimer with distal part of M4 domain connected to pCt containing cationic (red circles) and anionic residues. Activation of the channel is presented as the widened pore. An imaginary domain distal to the pCt region is tethered to the membrane for the convenience of intuitive understanding. **(a)** Electrostatic binding of Lys330 and Arg355–7 with PI(4,5)P₂ set the low basal activity of WT. **(b)** partial decrease in PI(4,5)P₂ level under ATP-free condition partly relieves the electrostatic tethering of Lys330, which activates the channel. **(c)** Excessive PI(4,5)P₂ level by exogenous application shuts off the channel. Putative electrostatic binding with unidentified residues and inhibited state are depicted. **(d)** Arg355–7 neutralization (R355–7A) partly enhance the electrostatic tethering of pCt, which inhibites the channel. **(e)** Lys330 neutralization (K330A) partly relieves the electrostatic tethering of pCt, which also activates the channel. **(f)** Lys330 and Arg355–7 neutralization (K330A/R355–7A) eliminates the electrostatic tethering of pCt, which also inhibites the channel.

직접적인 PI(4, 5)P₂ 혹은 poly-L-lysine 처리의 실험적 한계성

외부로부터 공급해준 PI(4,5)P₂는 C-말단의 돌연변이에 관계없이 TREK (TREK-1 & TREK-2) 활성을 억제하였다(Fig. 12). 이는 TM domain과 PI(4,5)P₂의 상호작용이나 C-말단 초기 특정 아미노산의 기능만으로 설명이 어렵다. Lys 330과 Arg 355-7을 제외한 C-말단의 다른 양전하 아미노산들 또한 세포막에 PI(4,5)P₂가 다량 존재할 경우에 정전기적 상호작용을 통하여 활성 억제에 기여할 것으로 생각된다(Fig. 17 c). 따라서 직접적인 PI(4,5)P₂ 처리에 따른 채널의 완전한 억제는 극단적인 상황으로 인한 활성 소실 상태이고 세포 자체적으로 조절되는 PI(4,5)P₂ 변화와는 다른 조건으로 생각된다. 따라서 inside-out 패치클램프 조건에서 PI(4,5)P₂를 직접 처리하는 방식을 통한 실험 결과를 분석할 경우에는 주의해야 한다.

또한 PLL 을 세포막으로부터 PI(4,5)P₂ 제거를 위한 방법으로 처리한 실험 결과 또한 해석에 유의해야 한다. Inside-out 패치클램프 실험 결과를 분석해 보면 PLL의 처리는 돌연변이에 관계없이 모든 TREK 활성을 억제했다. PLL 처리에 의한 TREK 전류의 억제 효과는 PLL 처리를 중단한 이후에도 지속된다. PLL 처리시 관찰되는 TREK 활성의 억제는 일반적인 세척으로는 복구되지 않았으며 PLL과 강력하게 결합하는 heparin 처리 없이는 TREK 전류의 억제 효과가 쉽게 사라지지 않는다(Fig. 5). PLL은 세포 내측의 PI(4,5)P₂ 뿐만 아니라 다른 음전하 물질들과 결합하여 추가적인 다른 자극 혹은 물질들에 대한 반응을 확인하기 어려울 것으로 생각된다. PI(4,5)P₂ 농도에 따라 정밀하게 조절되는 반응을 측정할 경우에는 PLL과 같은 양전하를 많이 띠는 약물의 처리는 지양해야 하며 그 결과를 분석 및 해석하는데 조심해야한다.

제 2 부. 산성 pHi 에 의한 TREK 조절을
매개하는 C-말단의 음전하성 아미노산

서론

세포 내 산성화에 의한 TREK 활성화 조절

TREK의 세포 내 산성화에 의한 활성화 조절은 매우 중요한 특성 중의 하나이다. 생쥐의 TREK-1 (mTREK-1) C-말단에 존재하는 음전하 아미노산인 306 번 글루탐산 (Glu, E) 은 세포 내 산성도를 감지하는데 중요하다고 알려져 있다. 306번 글루탐산을 점 변이를 통하여 전하성을 가지지 않은 알라닌으로 치환한 경우에 세포 내 산성화에 채널의 활성이 증가하지 않았다(Chemin et al., 2006). 그리고 306번 글루탐산을 알라닌으로 치환한(mTREK-1 E306A) 경우에 야생형과 비교하여 활성이 높았으며 아라키돈산에 대한 반응이나 신전자극에 의한 추가적인 활성 증가가 나타나지 않았다(Chemin et al., 2006). Chemin 연구 그룹에 따르면 세포막 PI(4,5)P₂와 C-말단 초기의 양전하를 가지는 아미노산들이 정전기적 인력을 통해 상호작용을 한다. 반면에 음전하를 가지는 아미노산은 PI(4,5)P₂와 양전하 아미노산 사이의 인력을 방해한다. 306번 글루탐산이 음전하를 잃으면 양전하 아미노산들과 PI(4,5)P₂ 사이의 인력이 강해져서 C-말단이 세포막에 가까워지며 구조가 변화하게 된다. C-말단의 구조 변화는 pore 부위에 영향을 주어서 채널이 활성화된다고 설명하였다(Chemin et al., 2007).

그러나 본 연구자가 수행한 앞선 연구에서는 PI(4,5)P₂ 농도 증가에 따른 TREK의 양방향적인 조절을 주장하였으며, 내부적인 PI(4,5)P₂의 증가는 TREK을 억제하는 방향으로 조절한다는 것을 제시하였다. 세포막 PI(4,5)P₂의 증가는 TREK C-말단과 형성하는 정전기적 인력을 강화할 것으로 생각된다. Chemin 연구 그룹의 가설에 따르면 PI(4,5)P₂와 C-말단 사이에 형성되는 정전기적 인력의 강화는 TREK 활성을 증가시킨다. 그러나 본 연구자가 수행한 연구에 따르면 PI(4,5)P₂ 증가에 따른 PI(4,5)P₂와 C-말단 사이에 형성되는 정전기적 인력의 강화는 채널 활성을 억제하였다. 같은 PI(4,5)P₂와 C-

말단 사이에 정전기적 효과의 강화 임에도 서로 다른 결과를 보인다. 앞선 가상의 모델들로는 $PI(4,5)P_2$ 에 따른 TREK 활성화 조절과 세포 내 산성화에 의한 TREK 활성화 조절을 함께 설명하지 못한다. 따라서 본 연구자는 세포 내 산성화에 따른 TREK C-말단에 의한 활성화 조절에 대하여 연구를 진행하였다.

TREK-2의 세포 내 산성화에 따른 활성화 조절은 TREK-1에 비하여 연구가 되지 않았다. TREK-1과 TREK-2의 C-말단 근위부가 매우 유사한 아미노산 서열을 가지고 있기는 하지만 mTREK-1의 306번 글루탐산 위치가 TREK-2에서 세포 내 산성화에 대한 채널의 활성화 반응을 조절하는 위치 인지에 대해서는 알려진 바가 없다. 세포 내 산성화에 따른 TREK-2 활성화 조절에 대한 연구는 한 건에 불과하다. 연구 내용을 살펴보면, TREK-2의 C-말단 부위를 mutation을 통해 변형하여 TREK-2 특성에 변화가 있는지 연구하였다. 이에 따르면 334번 글라이신부터 343번 트립토판($G^{334}EIKAHAAEW^{343}$)이 세포 내 산성화에 의한 채널의 활성화 증가에 중요하다고 제시되었다(Kim et al., 2001).

앞서 이야기 하였듯이 TREK-2 C-말단 근위부는 TREK-1 C-말단 근위부와 거의 동일하다. 그럼에도 hTREK-2 연구를 통해 제시된 334번부터 343번 아미노산 사이에는 세포 내 산성화에 따른 mTREK-1 조절에 중요하다고 알려진 306번 글루탐산이 포함되지 않는다. 이러한 연구들을 바탕으로 C-말단의 전하를 띄는 아미노산들을 알라닌으로 각각 치환하여 TREK 활성을 측정하였다. ATP와 세포 내 산성화를 통한 TREK-1과 TREK-2 채널의 조절에 C-말단의 어떠한 아미노산이 연관이 되어 있으며 어떻게 조절되는지 연구해 보았다.

결과

세포 내 산성화에 의한 TREK C-말단 돌연변이의 활성

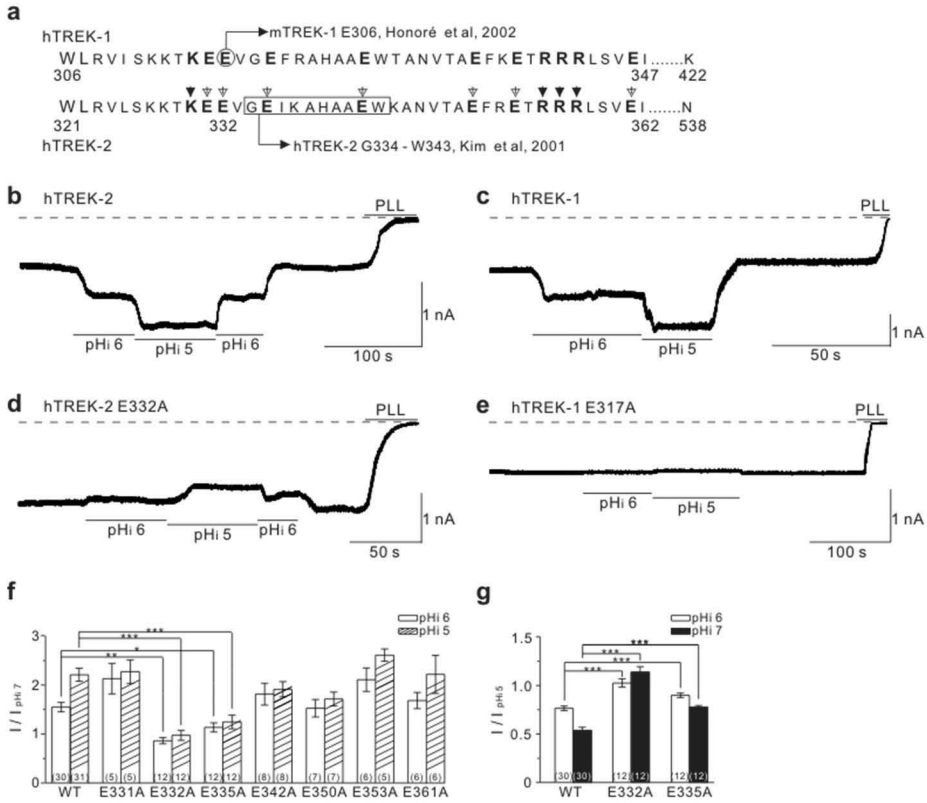


Figure 18. Responses of ITREK-2, i-o and ITREK-1, i-o to acidic pHi in WT and mutants with pCt Glu substituted with Ala.

(a) The sequence of hTREK channel family. pCt domain of hTREK channel family has cationic and anionic amino acids cluster. The mutated amino acids in the pCt are indicated by open and closed arrow heads for the negatively charged amino acids and the positively charged amino acids, respectively (b, c) Representative traces of ITREK-2,i-o and ITREK-1,i-o at -60 mV with symmetrical KCl solutions. WT hTREK-2 and hTREK-1 channels were commonly activated by pH_i 6 and 5 (d,e) ITREK-2,i-o of E332A and ITREK-1,i-o of E317A were partly decreased by pH_i 6 and 5. (f) Summary of the ITREK-2,i-o at pH_i 6 and 5 normalized to the current at pH_i 7.0 measured in the seven mutants and WT hTREK-2. Bar graphs show mean ± SEM, and the numbers of tested cells are indicated in each bar (***, $P < 0.001$; **, $P < 0.01$; *, $P < 0.05$). Note the absent or less sensitive activation by the acidic pH_i in E332A and E335A. (g) Summary of ITREK-2,i-o at pH_i 7 and 6 normalized to the amplitude at pH_i 5 in WT, E332A, and E335A.

TREK C-말단의 전하를 가지는 아미노산들은 세포막 인지질들과의 상호작용을 통하여 채널의 활성을 조절한다(Chemin et al., 2007; Honore et al., 2002; Kim et al., 2001). C-말단 근위부의 음전하 아미노산은 323번에서 363번 아미노산 사이에 7개(331, 332, 335, 342, 350, 353, 361)의 글루탐산(Glu, E)이 존재한다(Fig. 8 a, 하얀 화살표로 표시). 7개의 글루탐산을 알라닌(Ala, A)으로 각각 치환하여 음전하의 영향을 제거해 주었다. 각각의 플라스미드는 HEK293T 세포에 발현을 유도하였으며, inside-out 패치클램프를 통하여 세포 내부와 외부의 용액을 동일한 KCl 농도로 하여 실험을 진행하였다. 세포막전압을 -60 mV로 고정하여 전류를 기록 하였다.

hTREK-2 내향 전류의 안정적인 활성을 확인 후, 세포 내 용액의 산성도를 단계적으로(pH 7.0, 6.0, 5.0) 변화시켰다. 산성도가 낮아짐에 따라 전류는 단계적으로 증가하였다(Fig. 18b). 단계적인 세포 내 산성화에 따른 전류의 증가는 hTREK-1 에서도 동일하게 관찰되었다(Fig. 18c). 앞선 실험들에서 TREK-1 전류와 TREK-2 전류는 비선택적인 음전하 가림 효과가 있는 10 μ g/mL의 PLL 처리에 억제되었다(Fig. 5)(Chemin et al., 2005; Chemin et al., 2007; Lopes et al., 2005). 이에 따라 inside-out 패치클램프에서 이온의 이동이 없는 기준 값 확인을 위하여 실험 마지막에 PLL을 처리하여 baseline을 확인하였다. 세포 내 산성화에 대한 hTREK-2 전류의 반응을 비교하기 위하여 pHi 7.0에서의 전류 크기를 기준으로 pHi 5.0과 pHi 6.0 전류를 상대 표준화하여 정리하였다.

음전하 아미노산인 7개의 글루탐산을 각각 점 변이를 통해 알라닌으로 치환하여 ATP에 대한 반응성 및 세포 내 산성화에 대한 반응성을 확인하였다. hTREK-2 E332A와 hTREK-2 E335A을 제외한 나머지 돌연변이들의 세포 내 산성화에 대한 반응은 야생형과 다르지 않았다.

특이하게도 hTREK-2 E332A 전류는 pHi 5.0과 pHi 6.0 산성화에 대하여 미약하게 억제되었다(Fig. 18b, f). hTREK-2의 E332에 해당하

는 hTREK-1의 317번 글루탐산을 알라닌으로 치환한 경우에도 세포 내 산성화에 따른 hTREK-1 전류의 증가가 나타나지 않았다(Fig. 18e). hTREK-2 E335A는 세포 내 산성화에 따라 전류의 증가는 나타나지만 야생형에 비하여 전류의 증가율이 유의성 있게 감소했다(Fig. 18f). hTREK-2 전류의 크기는 최대 활성을 유도한 pHi 5에서의 hTREK-2 전류를 기준으로 상대표준화하여 정리하였다. hTREK-2 E332A와 hTREK-1 E317A는 세포 내 산성도 변화에 따른 전류의 변화가 없었다(Fig. 18g).

TREK C-말단 돌연변이들의 ATP 및 산성화에 대한 반응

세포질의 ATP는 PI-kinase 활성을 촉진하여 세포막의 $PI(4,5)P_2$ 의 합성을 증가시킨다. hTREK-2 활성은 $PI(4,5)P_2$ 의 추가적인 합성 혹은 공급에 의해 억제된다. ATP에 의한 TREK 활성의 억제 반응과 세포 내 산성화에 의한 활성 증가는 C-말단과 연관되어 있다. 따라서 세포 막 안쪽에 ATP 공급을 통한 채널 활성의 부분적인 억제 상태가 기본적인 TREK의 활성 상태로 생각된다. ATP에 의한 부분적인 채널 활성 억제 조건에서 세포 내 산성화에 대한 채널의 반응을 확인 하였다.

세포 내 ATP에 의한 채널 활성 억제가 산성화에 의한 활성 증가에 영향을 주지는 않을까? 세포 내 ATP에 의한 TREK-2 전류의 억제에도 산성화에 의해 전류는 증가했다(Fig. 19a). 흥미롭게도, hTREK-2 E332A 돌연변이는 ATP에 의한 활성 억제가 나타나지 않았고 세포 내 산성화(pHi 5.0)에 따라 전류가 조금 감소했다(Fig. 19b, e). hTREK-2 E335A는 ATP에 의한 활성 억제는 나타났지만 산성화에 의한 활성 증가가 야생형에 비해 감소했다(Fig. 19c). hTREK-2 E335 위치에 해당하는 hTREK-1 E320을 알라닌으로 치환하여 ATP에 의한 활성 억제와 세포 내 산성화에 대한 반응을 확인해 보았다. hTREK-1 E320A는 세포 내 산성화에 대한 반응성 감소를 예측했지만 반응성에 변화가 없었다(Fig. 19d). Inside-out 패치클램프를 통해 기록한 각각

의 돌연변이들의 조건 별(ATP, ATP with pHi 5.0) 전류를 세포 내 용액 pH 7.0 조건을 기준으로 상대표준화 하여 정리했다. hTREK-2 E332A는 ATP와 세포 내 산성화에 대한 반응이 나타나지 않았고, hTREK-2 E335A는 세포 내 산성화에 대한 반응성이 감소했다(Fig. 19e).

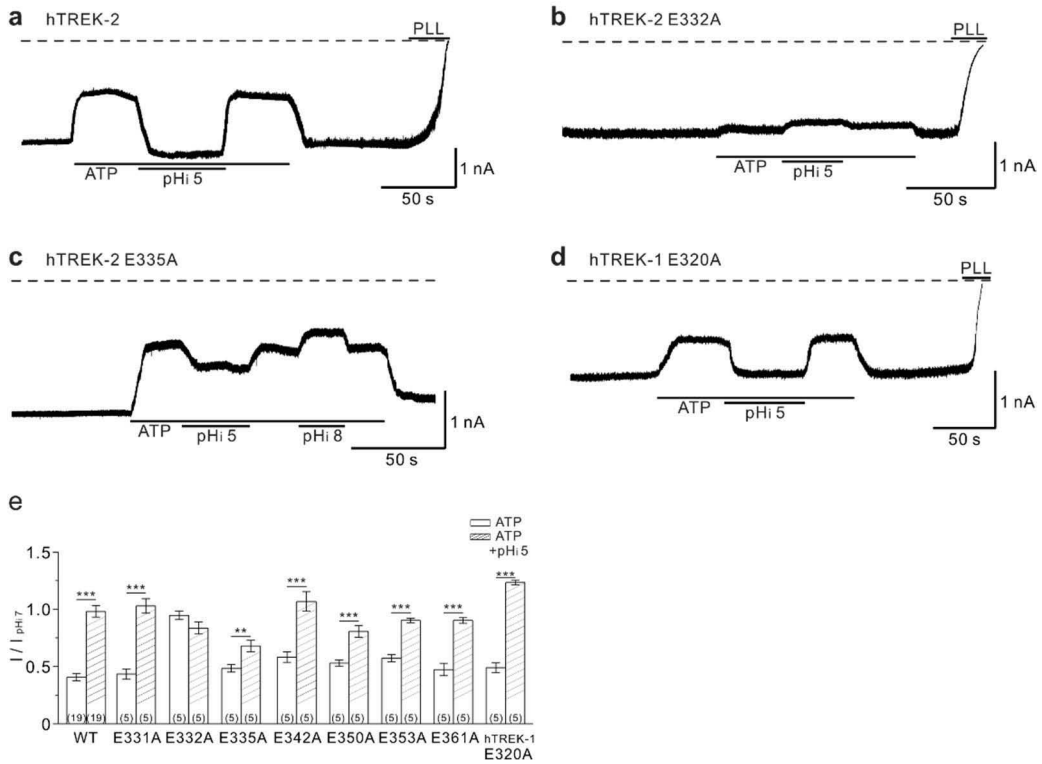


Figure 19. Responses of hTREK-2, i-o and hTREK-1, i-o to acidic pHi with ATP in WT and Glu neutralizing mutants.

(a) WT hTREK-2, i-o was inhibited by applying 3 mM MgATP to the cytoplasmic side, and the additional acidification to pHi 5 increased the current(-60 mV of holding voltage under symmetrical KCl condition). (b) Insignificant effect of ATP and acidic pHi on E332A hTREK-2, i-o. (c) Inhibition of E335A hTREK-2, i-o by ATP and less significant activation by pHi 5 than WT. (d) Inhibition of E320A hTREK-1, i-o by ATP and activation by pHi 5 similar to WT. (e) Summary of the hTREK-2, i-o inhibition by ATP and activation by pHi 5 normalized to the current at pHi 7.0 measured in the WT and seven mutants of hTREK-2 neutralizing Glu in pCt. The summary of hTREK-1 E320A is also shown (***) $P < 0.001$, ** $P < 0.01$).

hTREK-2 E332A 돌연변이는 세포 내 산성화에 의한 활성 증가 반응이 사라졌다. 그렇다면 hTREK-2 E332A는 세포 내 산성화 외 추가적인 활성 증가 조건에는 반응할까? 아라키돈산과 2-APB와 같은 활성제에 대한 hTREK-2 E332A의 반응을 whole-cell 패치클램프를 통해 기록했다. hTREK-2 E332A는 야생형과 다르게 아라키돈산과 2-APB에 대해 반응이 없었다(Fig. 20a, b).

세포 밖 용액의 산성화에 TREK-2는 활성이 증가되고 TREK-1은 활성이 감소하는 서로 다른 특성을 가지고 있다(Sandoz et al., 2009). hTREK-2 E332A는 야생형과 다르게 세포 밖 산성화(pHe 6.5)에도 전류가 증가하지 않았다(Fig. 20c, e). 반면에 세포 밖 산성화(pHe 6.5)는 hTREK-1 야생형과 hTREK-1 E317A의 활성을 모두 억제했다(Fig. 20d, f). 10 μ M 아라키돈산으로 최대 활성을 유도한 hTREK-1 전류를 기준으로 상대표준화하여 세포 밖 용액 산성화(pHe 7.4 to 6.5) 조건의 전류를 정리했다. 야생형은 58.2%에서 18.6% 그리고 E317A는 93.8%에서 59.5%로 각각 39.6% 그리고 34.3% 감소하였다(Fig. 20f).

hTREK-2 E332A는 ATP에 의한 활성의 억제가 나타나지 않았다. 즉, hTREK-2 E332A는 ATP로 생성되는 PI(4,5)P₂의 합성에도 아무런 영향을 받지 않는다고 해석된다. 다른 자극들에는 반응하지 않았지만 세포막 안쪽에 직접적으로 처리한 10 μ M PI(4,5)P₂에는 활성이 억제되었다(Fig. 21 a, n = 5). 직접적인 PI(4,5)P₂의 처리는 hTREK-1 E317A의 활성도 억제했다(Fig. 21b, n = 3).

hTREK-2 E332A와 hTREK-2 K330A에서는 채널의 높은 활성 상태와 ATP에 의한 억제 반응 소실이 관찰되었다. hTREK-2 R355-7A는 hTREK-2 E332A와 상반되는 낮은 활성 상태와 활성 자극에 대하여 큰 반응이 나타났다(Fig. 15a). hTREK-2 활성을 변화시키는 E332와 R355-7을 모두 알라닌으로 치환하여 활성 상태와 활성 자극에 대한 반응을 관찰하였다. hTREK-2 E332A / R355-7A는 inside-out 패치클램프에서 200-300 pA정도의 전류 크기를 보였으며 세포 내

산성화에 대한 활성 증가는 나타나지 않았다(Fig. 22a). 세포 내 산성화에 의한 활성 증가는 hTREK-2 E332A / R355-7A에서 나타나지 않았으나 2-APB에 의한 활성은 증가는 whole-cell 패치클램프를 통해 관찰되었다(Fig. 22b).

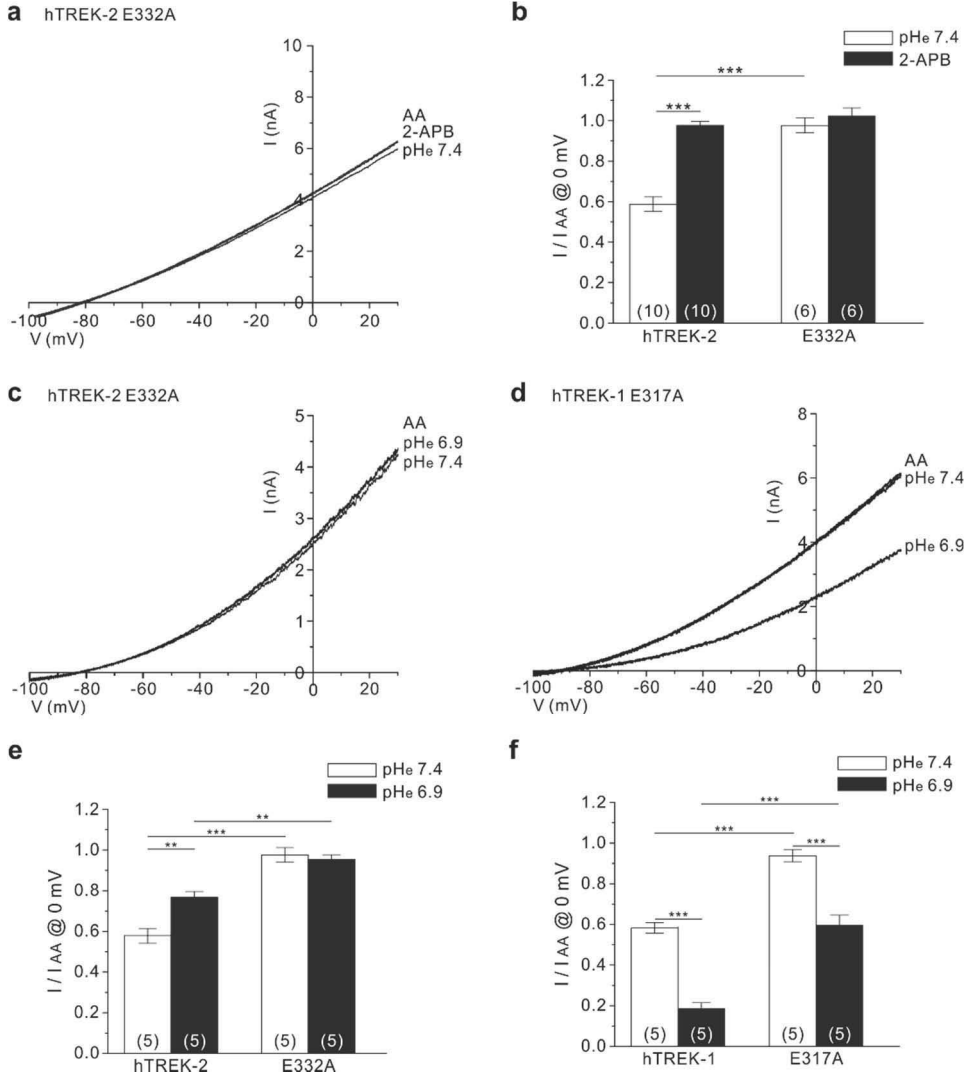


Figure 20. Whole-cell patch clamp studies comparing the effects of 2-APB and pH on the ATP- and acidic pH-resistant mutants of hTREK-2.

Under the whole-cell patch clamp condition, current-voltage relations (I/V curves) were obtained by ramp-like depolarizing pulses from -100 to 30 mV (pulse duration, 500 ms; holding voltage, -80 mV) at every 10 s. 10 μ M 2-APB was applied before confirming the full activation of $I_{TREK-2,w-c}$ by arachidonic acid(AA). **(a)** E332A showed no further activation by 2-APB and AA. **(b)**

Summary of $I_{\text{TREK-2,w-c}}$ at 0 mV normalized to the maximum amplitude induced by 10 μM AA in each cell (mean \pm SEM). acidic pH_e 6.9 was applied before confirming the full activation of $I_{\text{TREK-2,w-c}}$ by AA. **(c)** E332A showed no further activation by pH_e 6.9. **(d)** $I_{\text{TREK-1,w-c}}$ of E317A hTREK-1 inhibited by pH_e 6.9. **(e,f)** Summary of $I_{\text{TREK-2,w-c}}$ and $I_{\text{TREK-1,w-c}}$ at 0 mV normalized to 10 μM AA-induced current (mean \pm SEM). the numbers of tested cells are indicated in each bar (** for $P < 0.01$, * for $P < 0.05$).

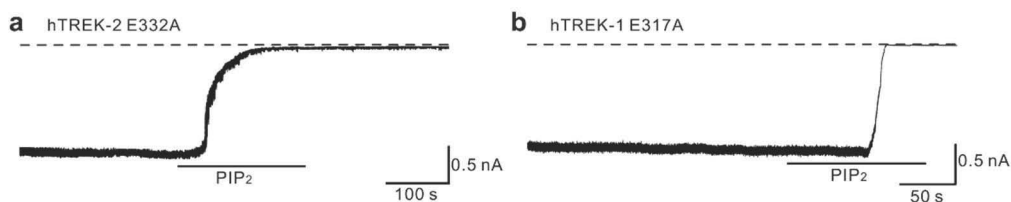


Figure 21. Indiscriminate inhibition of ATP-resistant mutants by exogenous $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$.

(a-b) Representative traces of hTREK-2 mutants (E332A) and hTREK-1 mutant (E317A) showing the abolishment of $I_{\text{TREK-2,i-o}}$ and $I_{\text{TREK-1,i-o}}$ on application of 10 μM $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$.

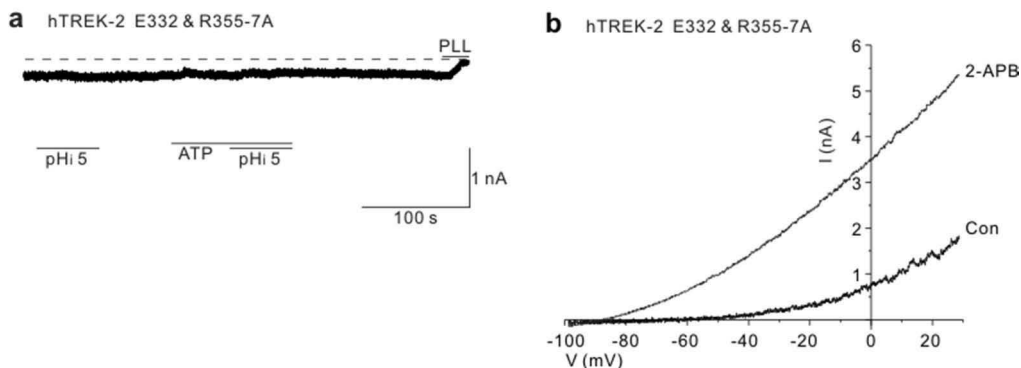


Figure 22. Responses of E332A/R355-7A $I_{\text{TREK-2, i-o}}$ to acidic pHi with ATP and E332A/R355-7A $I_{\text{TREK-2, w-c}}$ to 2-APB.

(a) A representative case of E332A / R355-7A $I_{\text{TREK-2,i-o}}$ showing low activity, no inhibition by ATP and activation by pHi 5. **(b)** $I_{\text{TREK-2,w-c}}$ of E332A / R355-7A hTREK-2 Showed less activity and activated by 2-APB.

고찰

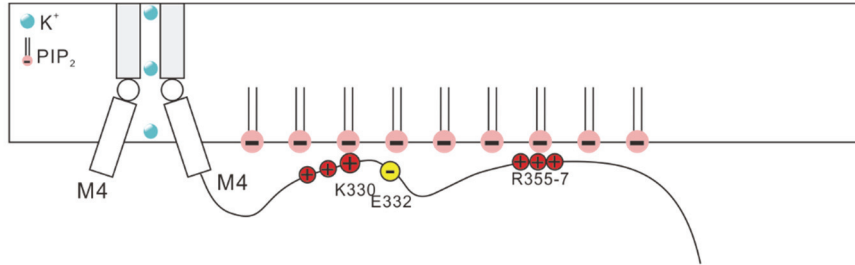
세포 내 산성화 조건에서 TREK C-말단 음전하 아미노산에 의한 활성 변화

본 연구를 통하여 TREK-2 에서 세포 내 산성화를 감지하는 C-말단 근위부의 글루탐산(Glu, E)들을 동정하였다. 332번 글루탐산뿐만 아니라 335번 글루탐산이 hTREK-2 의 세포 내 산성화에 대한 반응에 관여함을 확인했다. hTREK-2 335번 글루탐산의 음전하를 점 변이를 통해 제거 하였을 때는 산성화에 대한 반응성이 감소하였고 332 번 글루탐산을 점 변이 하여 음전하를 제거하였을 때는 산성화에 대한 반응 자체가 사라졌다. 그러나, hTREK-2 의 335번 글루탐산에 대응하는 hTREK-1 의 320번 글루탐산을 알라닌으로 치환하였으나 세포 내 산성화에 대한 반응성은 변하지 않았다(Fig. 18, Fig. 19). 즉, hTREK-1과는 다르게 hTREK-2에서는 332번 글루탐산 이외에 335번 글루탐산 또한 세포 내 산성화를 감지하여 활성을 조절하는 역할을 한다. TREK-1과 TREK-2의 C-말단 근위부는 유사한 서열을 가지고 있음에도 같은 자극 조건에 대하여 반응이 서로 다르다. 이는 TREK-1과 TREK-2 사이에 기능 혹은 역할에 차이가 있음을 나타낸다. 이러한 차이는 TREK이 다양한 자극에 대한 반응성을 가지는 바탕이 된다.

2016년 PNAS에 발표된 Levitz의 논문에 따르면 TREK 그룹 (TREK-1, TREK-2, and TRAAK)은 이형이량체(Heterodimerization)를 이루어 여러 자극들에 대해 활성이 조절 된다는 발표가 있다. 또한 성상교세포에서 TREK-1과 TWIK-1이 이항화결합을 통해 이형이량체를 이루어 TWIK-1의 특성과 TREK-1의 특성을 모두 가지는 채널로서 역할을 한다는 발표가 있다(Hwang et al., 2014). 이렇듯 최근 발표되는 논문들은 K2P 채널들이 이형이량체를 이루며 두 채널의 특성을 동시에 가지며 추가적인 역할들이 밝혀지고 있다(Plant et al.,

2012). 따라서 특정 조직이나 세포에서 하나의 채널 유전자 변이가 일어나 기능을 하지 못해도 이형이량체를 이루기 때문에 기능 자체에 문제가 없도록 기능을 보존한다.

a hTREK-2



b hTREK-2 E332A

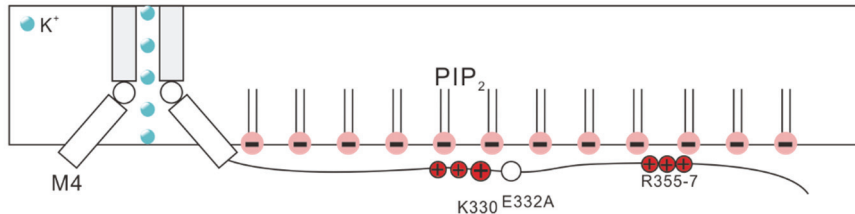


Figure 23. Cartoon summary of TREK-2 gating regulated by interaction between pCt Lys330, Glu332, Arg355–7 and PI(4,5)P₂.

Schematic drawing of TREK-2 dimer with distal part of M4 domain connected to pCt containing cationic (red circles) and anionic (yellow circle) residues. Activation of the channel is presented as the widened pore. An imaginary domain distal to the pCt region is tethered to the membrane for the convenience of intuitive understanding. **(a)** Electrostatic binding of Lys330 and Arg355–7 with PI(4,5)P₂ and repulsion of Glu332 set the low basal activity of WT. **(b)** Acidic pH_i or Glu332 neutralization (E332A) eliminates the electrostatic repulsion between pCt from plasmamembrane. The putatively enhanced tethering of pCt to the membrane activate the channel

Kim 등이 보고한 논문에 따르면 TREK-2의 세포 내 산성화 감지에 중요한 부분은 334번 글라이신(Gly, G)에서 343번 트립토판(Trp, W)까지의 아미노산 그룹이 제시되었다(Kim et al., 2001). 그러나 Chemin 등에 따르면 유사한 C-말단을 가지는 TREK-1에서는 세포 내 산성화 감지에 306번 글루탐산(TREK-2의 332번 글루탐산)이 중

요하다고 제시했다(Bagriantsev et al., 2011, 2012; Chemin et al., 2005; Honore et al., 2002; McClenaghan et al., 2016; Piechotta et al., 2011; Renigunta et al., 2015; Sandoz et al., 2011). 본 연구자의 실험결과와 종합해보면 Chemin 등에 의해 주장된 mTREK-1의 E306에 해당하는 hTREK-2 332번 글루탐산과 Kim 등에 의해 주장된 334번에서 343번 아미노산 사이의 335번 글루탐산 모두 TREK-2의 세포 내 산성화에 따른 활성 조절에 중요하다. 세포 내 산성화 조건에서 hTREK-2 332번 글루탐산은 수소이온과 결합하여 마치 점 변이한 E332A와 같이 음전하를 잃기 때문에 세포막 인지질과 C-말단 사이의 정전기적 반발력이 감소하고 인력이 증가한다(Fig. 23b). 세포막 인지질과 C-말단 사이의 정전기적 상호작용에서 E332에 의한 반발력이 약해지면 마치 경첩과 같은 역할을 하는 330번 라이신과 세포막 PI(4,5)P₂ 사이의 정전기적 결합에 변화가 생기며 채널의 활성이 증가한다.

세포 내 산성화 반응 저항성 돌연변이의 TREK 활성 변화

점 변이를 통한 mTREK-1 306번 글루탐산의 중성화는 mTREK-1을 AA와 같은 활성제에도 더 이상 활성이 증가하지 않는 높은 활성 상태로 변화시킨다(Chemin et al., 2005; Honore et al., 2002). mTREK-1 E306A에 해당하는 hTREK-2 E332A는 아라키돈산, 2-APB, 그리고 세포 밖 산성화에 반응하지 않았으며 높은 활성 상태를 나타냈다(Fig. 19, Fig. 20). hTREK-2 K330A는 야생형에 비하여 높은 활성 상태를 유지하고 있으며 활성제에 대해 반응성이 약했다(Fig. 13c, d). TREK은 세포 내 산성화뿐만 아니라 세포 밖 산성화에 대해서도 반응성을 가지고 있다. TREK의 세포 밖 산성화에 의한 채널 활성 조절은 C-말단 부위가 아니라 첫 번째 pore 구조를 형성하는 M1P1 extracellular loop 부분의 hTREK-1의 126번 히스티딘(His, H)과 hTREK-2의 151번 히스티딘에 의해 조절된다. 반면에 hTREK-1은

세포 밖 산성화에 대하여 채널의 활성이 억제되고 hTREK-2는 세포 밖 산성화에 의해 채널 활성이 증가한다. 이는 hTREK-1과 hTREK-2 P2M4 부분의 반대되는 정전기적 극성 때문에 구조적 변화가 다르게 일어나기 때문이다 (Sandoz et al., 2009). hTREK-1 돌연변이 가운데 활성제에 대한 반응성이 없었던 K315A와 E317A는 세포 밖 산성화 (pHe 6.9)에 의해 채널이 모두 억제되었다(Fig 13, Fig. 20). 그리고 세포 밖 산성화(pHe 6.9)에 의한 TREK-1 활성의 억제는 아라키돈산 처리로 유도한 hTREK-1 최대 전류를 기준으로 야생형과 돌연변이에서 모두 30% 감소하였다. 이는 C-말단의 채널 활성 조절과 세포 밖 extracellular loop 부분에 의한 채널 활성 조절 기전이 서로 다르며 독립적으로 채널 활성에 영향을 미치는 것을 의미한다. 따라서 TREK-2 E332A와 K330A 돌연변이에서 관찰되는 높은 활성 상태는 활성제 혹은 세포 밖 산성화에 대한 반응성이 사라진 것이 아니라 활성이 최대로 증가되어 추가적인 활성 증가가 나타나지 않는 것으로도 해석 가능하다.

학위과정 동안 수행한 TREK 실험을 종합해보면 ATP 는 PI-kinase를 통한 $PI(4,5)P_2$ 합성으로 TREK 활성을 조절하며 $PI(4,5)P_2$ 는 PI-kinase와 PI-phosphatase의 균형적인 활동에 의해 세포막에 분포되어 있다. TREK의 생리적 활성은 낮게 유지되고 있으며 이는 $PI(4,5)P_2$ 에 의한 조절의 결과이다. $PI(4,5)P_2$ 의 농도에 따라 TREK은 낮은 분포의 $PI(4,5)P_2$ 에 대해서는 채널 활성이 증가하고 다량의 $PI(4,5)P_2$ 에 의해서는 채널의 활성이 억제되는 양방향성의 특성을 가진다. 따라서 낮은 농도의 $PI(4,5)P_2$ 분포에서는 농도 증가에 따라 채널 활성이 증가하고 세포막에 $PI(4,5)P_2$ 분포가 높아지면 채널의 활성이 억제된다. 이러한 $PI(4,5)P_2$ 에 따른 TREK 의 활성 조절은 채널 C-말단의 초기 부분과 $PI(4,5)P_2$ 와의 정전기적 상호작용에 따라 조절된다. hTREK-2 를 기준으로 C-말단의 330번 라이신과 355-7번 알지닌이 세포막 $PI(4,5)P_2$ 와의 상호작용에 매우 중요하다. 355-7번 알

지닌이 낮은 분포의 세포막 $PI(4,5)P_2$ 에도 정전기적 상호 작용을 통하여 채널 활성을 증가시키는 역할을 하는 반면에 330번 라이신은 높은 분포의 세포막 $PI(4,5)P_2$ 와의 정전기적 인력을 통해 C-말단을 세포막에 가깝게 유지하며 hTREK-2의 활성 억제에 중요한 부분으로 생각된다. TREK의 낮은 활성은 다양한 자극이나 환경으로 인한 채널 활성의 증가에 바탕이 되고 낮게 유지되던 채널의 활성이 증가됨으로서 세포막 전압의 과분극을 일으켜 다른 이온채널들의 활성을 낮추거나 활동전위를 낮추는 역할을 한다. 그리고 세포 내 산성화에 따른 채널 활성 증가에 중요한 부분은 hTREK-2 C-말단의 332번과 335번 글루탐산이다. TREK의 활성은 C-말단의 전하를 가지는 아미노산들과 $PI(4,5)P_2$ 사이에 정전기적 인력과 척력이 정교하게 조절되며 채널의 활성을 조절 할 것으로 생각된다. C-말단에 의한 TREK 활성 조절 기전을 완벽히 이해하기 위해서는 C-말단의 구조 연구와 전기적 전하를 가지는 C-말단의 아미노산들에 대한 추가적인 연구가 반드시 필요하다.

재료 및 방법

세포배양

인간배아신장(HEK293T) 세포주 (ATCC, Manassas, VA, USA)와 COS-7 세포주를 10 % FBS(FBS: Hyclone, Logan, UT, USA), 1 % penicillin-streptomycin (Gibco, Grand Island, NY, USA)이 포함된 DMEM (Gibco, Grand Island, NY, USA) 배양액으로 37 °C, 20 % O₂, 10% CO₂가 공급되는 배양기에서 유지하였다. 미분화 B 림프구 세포주 WEHI-231는 10 % FBS, 50 µM 2-mercaptoethanol (Sigma, St. Louis, MO, USA), 1 % penicillin-streptomycin (Gibco, Grand Island, NY, USA)이 포함된 25 mM HEPES-RPMI 1640 배양액으로 37 °C, 20% O₂, 5 % CO₂가 공급되는 배양기에서 유지하였다.

성상교세포 분리

대뇌 피질의 성상교세포를 분리하기 위하여 C57BL /6 생쥐의 생후 2일된 새끼를 사용하여 분리하였다. 적절한 밀도의 성상교세포를 얻기 위하여 1회에 4마리 정도의 생쥐를 사용하였으며 각각 T25 세포배양 플라스크에 배양을 하였다. 분리의 순서는 아래와 같이 수행하였다.

1. 세포분리 1 일전, 세포배양에 사용할 T25 세포배양 플라스크와 유리 커버 슬립 (12 mm)을 0.1 mg/mL poly D-lysine(PDL)을 처리하여 24 시간 코팅해준다. 그리고 분해에 필요한 멸균한 수술도구(수술가위, 포셉, 평면 팁 포셉), 칼슘 및 마그네슘이 제거된 HBSS (Invitrogen, cat.14175095)를 준비한다.
2. 새끼 생쥐 목 뒤를 부드럽게 쥐고 70 % 에탄올을 사용하여 부드럽게 닦아주고 머리와 목 사이 부위를 수술 가위를 사용하여 절개 하여준다.
3. 두개골을 고정하여주고 두피를 뒤쪽에서 앞쪽으로 절개하여 제거한다.
4. 날카로운 가위를 사용하여 두개골을 절개하여 양쪽방향으로 두개골을 모두 제거하여 준다. 두개골을 절제 할 때, 뇌 조직이 상하지 않도록 조심해야 한다.
5. 분리한 뇌조직은 각각 HBSS 로 가득 찬 60 mm dish 에 넣어준다. 주의할 점은 뇌 조직이 마르지 않도록 HBSS에 잠겨 있어야 한다.
6. 뇌 조직을 중양선을 따라 sagittal cut을 하여 소뇌부위를 제거하여 준다.

7. 조직분리 현미경으로 보면서 중뇌와 시상부위를 조심스럽게 제거하여 대뇌 반구예의 피질과 해마부분이 남는다.
8. 피질 부위를 남기고 날카로운 포셉을 이용하여 해마 부위를 제거하여 준다.
9. 마지막으로 투명한 막으로 보이는 뇌 척수막을 조심스럽게 제거한다.
10. 뇌척수막을 제거한 대뇌 피질부위를 새로운 HBSS 로 가득찬 60 mm dish에 옮겨준다.
11. 분리한 조직을 hemocytometer 를 사용하여 세포로 분리하고 이를 파이펫팁을 이용하여 다시한번 분리해 준다.
12. 원심분리기를 사용하여 300 G 로 5분동안 세포와 용액을 분리해주고 상층액을 제거한후, DMEM 배양액에 세포를 섞어준다.
13. 이를 PDL로 코팅한 T25 세포배양 플라스크에서 7-8 시간 정도 37°C 인큐베이터에서 배양해준다.
14. Pipetting 을 이용하여 플라스크에 부착되지 않은 세포들을 플라스크로부터 제거하여 주고 배양액으로 2번 씻어준다.
15. 2-3일 동안 37°C 인큐베이터에서 추가로 배양해 준다.
16. Patch clamp 에 사용하기 위하여 2-3 번째 추가적인 subculture시 0.1 mg/mL poly D-lysine(PDL)로 코팅한 유리 커버슬립에 세포를 분주해주어 배양한다.

플라스미드를 이용한 TREK-1 and TREK-2 발현 유도

사람의 TREK-1 (hTREK-1, RC214082) 과 TREK-2 (hTREK-2, SC222775) cDNA는 ORIGENE (Rockville, MD, USA) 회사를 통하여 구매 하였으며, Voltage-sensitive phosphatase gene of *Danio rerio* (Dr-VSP)는 DGIST의 서병창 박사님으로부터 제공받았다. Human M3 receptor의 cDNA는 mammalian expression vector인 pcDNA-3.1에 subcloned 하였다. hTREK-1과 hTREK-2 채널을 플라스미드를 세포에 주입하기 위해 FUGENE HD (Roche Molecular Biochemicals, USA) transient transfection 시약을 사용하였다. FUGENE HD 시약 1 μ l, DNA 1 μ g, 그리고 0.1 μ g 녹색형광단백질 (Green fluorescent protein, GFP) 을 100 μ l 의 FBS-free 배양액에 넣어 실온에서 20분간 반응시킨 후, DNA-FUGENE HD 혼합물을 세

포 배양액에 첨가를 하였다. 첨가 후 24시간 이후에 녹색 형광이 발현되는 세포를 선택하여 패치클램프 실험을 수행하였다. TREK/Dr-VSP를 같이 공발현 시킬 경우에는 TREK : Dr-VSP 비율을 1:10 의 비율로 발현시켜 사용을 하였다. hTREK-1 과 hTREK-2 의 모든 점 변이는 QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies, USA)를 사용하여 제작을 하였으며 유전자 서열에 추가적인 변이가 없는지 서열분석을 하여 확인하였다.

Table 1. List of mutation sites in the TREK C-terminal

cDNA	Mutation Site	From	To	cDNA	Mutation Site	From	To
hTREK-2	323	Arg	Ala	hTREK-2	337	Lys	Ala
hTREK-2	327	Lys	Ala	hTREK-2	342	Glu	Ala
hTREK-2	328	Lys	Ala	hTREK-2	350	Glu	Ala
hTREK-2	330	Lys	Ala	hTREK-2	361	Glu	Ala
hTREK-2	331	Glu	Ala	hTREK-1	315	Lys	Ala
hTREK-2	332	Glu	Ala	hTREK-1	317	Glu	Ala
hTREK-2	335	Glu	Ala	hTREK-1	320	Glu	Ala
hTREK-2	327/ 328/ 330	Lys	Ala	hTREK-1	340/ 341/ 342	Arg	Ala
hTREK-2	355/ 356/ 357	Arg	Ala	hTREK-2	377/ 378/ 379	Arg	Ala
hTREK-2	330/ 355-7	Lys/ Arg	Ala	hTREK-1	315/ 340-2	Lys/ Arg	Ala

전기생리학적 기록 및 분석

세포는 도립현미경 (TE2000-S, Nikon)에 설치된 패치클램프용 레코딩 챔버에 옮겨 실험을 진행 하였다. 레코딩 챔버의 용액은 5 mL/min 정도의 속도로 흘려주었으며 전압고정법을 통한 실험은 실

험실 온도($22-25^{\circ}\text{C}$)에서 수행 하였다. 실험은 전세포 기록모드 (Whole-cell) 에서는 저항이 $3.5\text{ M}\Omega$ 인 유리미세전극을 사용하였으며 내측-외향 기록모드(inside-out)에서는 저항이 $7\text{ M}\Omega$ 인 유리미세전극을 사용하였다. 패치클램프 증폭기 (Axopatch-1C, Axon Instruments, Foster City, CA, USA)로 whole-cell 패치클램프와 inside-out 패치클램프 방법으로 전류를 측정하였으며 ADDA convertor (Digidata-1322A, Axon Instrument), pClamp 9.2 프로그램을 이용하여 전류 및 전압을 측정하였다. 기록된 전류들은 10 kHz 속도로 기록하였으며 low - pass 필터를 whole-cell 기록모드에서는 1 kHz 그리고 inside-out 기록모드에서는 2 kHz 로 하여 기록하였다. 기록된 데이터는 Clampfit 9.2 (Axon Instrument)와 Origin 8 (OriginLab, USA)을 이용하여 분석하였다. 단일 채널 데이터를 분석할 경우에 전체 채널의 활성(NPo)을 구하였는데, 이는 열려있는 채널이 관찰된 개수(N)와 채널이 열릴 확률(Po)을 통하여 얻었다.

실험 용액과 약물

본 실험에서 사용한 세포 내 용액과 세포 외 용액의 조성은 아래의 표와 같다. HEK293T, COS-7, WEHI-231, 그리고 생쥐 성상교세포에서 TREK채널 기록을 위해 사용한 세포 내용액과 세포외용액의 조성은 다음과 같다. Whole-cell 패치클램프 조건에서 세포 내용액은 (in mM) 135 KCl , 6 NaCl , 10 HEPES , 3 mM ATP (adenosine 5'-triphosphate magnesium salt), 그리고 5 EGTA (ethylene glycol tetraacetic acid), pH 7.2 with KOH을 사용하였으며, 세포외 용액은 145 NaCl , 3.6 KCl , 1 MgCl_2 , 1.3 CaCl_2 , 5 glucose , and 10 HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid), pH 7.4 with NaOH을 사용하였다. Inside-out 패치클램프 조건에서는 145 KCl , 0.1 EGTA , 10 HEPES , 20 sucrose , pH of 7.0 with KOH 로 실험하였다. 단일 채널을 기록할 경우에는 2가 양이온을 포함하지 않는 용액

(DVF) 으로 실험을 하였으며 일부 실험에서는 산성 용액(pH 5.0)을 위하여 HEPES 의 농도를 반으로 줄이고 5 mM MES [2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid] 을 첨가해 주었다. 용질들과 약물 들은 Sigma (St. Luis, MO) 를 통하여 구매하였으며 PI(4,5)P₂의 경우에는 Avanti Polar Lipids(Alabaster, AL, USA)에서 구매하였다. 그리고 PI(4,5)P₂는 얼음물에서 초음파 처리를 하여 용액에 첨가해 주었으며 60 분에 한번씩 추가적인 초음파 처리를 해 주었다. 자세한 용액의 조성은 아래표에 정리하였다.

Table 2. Solution List

	Bath solution				Pipette solution	
Solute (mM)	NT	NT(pH)	High K ⁺ (i-o)	High K ⁺ (pH)	High K ⁺	High K ⁺ (i-o)
NaCl	145	145	-	-	6	
KCl	3.6	3.6	145	145	135	145
CaCl ₂	1.3	1.3	-	-		
MgCl ₂	1	1	-	-		
Glucose	5	5	-	-		
HEPES	10	5	10	5	10	10
MES	-	5	-	5		
EGTA	-	-	0.1	-	5	0.1
MgATP	-	-	-	-	3	
Sucrose	-	-	20	20		20
pH	7.4	6.9	7	5-7	7.2	7.4

통계학적 분석

모든 실험결과는 Origin 8.0 (OriginLab) 과 GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc. USA) 으로 분석하고, 평균(mean) ± 표준 오차 (standard error of mean, SEM) 로 표기하였다. 통계학적 유의성은 Student's t-test 를 이용하였고, p-값이 각각 0.05 미만인 경우에 유의성을 보인다고 판단하였다.

참고 문헌

Acosta C, Djouhri L, Watkins R, Berry C, Bromage K, Lawson SN (2014) TREK2 expressed selectively in IB4-binding C-fiber nociceptors hyperpolarizes their membrane potentials and limits spontaneous pain. *J Neurosci* 34:1494-509 DOI 10.1523/JNEUROSCI.4528-13.2014

Andharia N, Joseph A, Hayashi M, Okada M, Matsuda H (2017) Involvement of intracellular transport in TREK-1c current run-up in 293T cells. *Channels (Austin)* 11:224-235 DOI 10.1080/19336950.2017.1279368

Aryal P, Jarerattanachai V, Clausen MV, Schewe M, McClenaghan C, Argent L, Conrad LJ, Dong YY, Pike ACW, Carpenter EP, Baukrowitz T, Sansom MSP, Tucker SJ (2017) Bilayer-Mediated Structural Transitions Control Mechanosensitivity of the TREK-2 K2P Channel. *Structure* 25:708-718 e2 DOI 10.1016/j.str.2017.03.006

Bagriantsev SN, Peyronnet R, Clark KA, Honore E, Minor DL, Jr. (2011) Multiple modalities converge on a common gate to control K2P channel function. *EMBO J* 30:3594-606 DOI 10.1038/emboj.2011.230

Bagriantsev SN, Clark KA, Minor DL, Jr. (2012) Metabolic and thermal stimuli control K(2P)2.1 (TREK-1) through modular sensory and gating domains. *EMBO J* 31:3297-308 DOI 10.1038/emboj.2012.171

Bandulik S, Tauber P, Lalli E, Barhanin J, Warth R (2015) Two-pore domain potassium channels in the adrenal cortex. *Pflugers Arch* 467:1027-42 DOI 10.1007/s00424-014-1628-6

Bang H, Kim Y, Kim D (2000) TREK-2, a new member of the mechanosensitive tandem-pore K⁺ channel family. *J Biol Chem* 275:17412-9 DOI 10.1074/jbc.M000445200

Beltran L, Beltran M, Aguado A, Gisselmann G, Hatt H (2013) 2-Aminoethoxydiphenyl borate activates the mechanically gated human KCNK channels KCNK 2 (TREK-1), KCNK 4 (TRAAK), and KCNK 10 (TREK-2). *Front Pharmacol* 4:63 DOI 10.3389/fphar.2013.00063

Bista P, Cerina M, Ehling P, Leist M, Pape H-C, Meuth SG, Budde T (2015) The role of two-pore-domain background K⁺ (K2P) channels in the thalamus. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* 467:895-905 DOI 10.1007/s00424-014-1632-x

Bista P, Pawlowski M, Cerina M, Ehling P, Leist M, Meuth P, Aissaoui A, Borsotto M, Heurteaux C, Decher N, Pape HC, Oliver D, Meuth SG, Budde T (2015) Differential phospholipase C-dependent modulation of TASK and TREK two-pore domain K⁺ channels in rat thalamocortical relay neurons. *J Physiol* 593:127-44 DOI 10.1113/jphysiol.2014.276527

Buckler KJ, Williams BA, Honore E (2000) An oxygen-, acid- and anaesthetic-sensitive TASK-like background potassium channel in rat arterial chemoreceptor cells. *The Journal of Physiology* 525:135-142 DOI 10.1111/j.1469-7793.2000.00135.x

Cabanos C, Wang M, Han X, Hansen SB (2017) A Soluble Fluorescent Binding Assay Reveals PIP₂ Antagonism of TREK-1 Channels. *Cell Rep* 20:1287-1294 DOI 10.1016/j.celrep.2017.07.034

Chemin J, Patel AJ, Duprat F, Lauritzen I, Lazdunski M, Honore E (2005) A phospholipid sensor controls mechanogating of the K⁺ channel TREK-1. *EMBO J* 24:44-53 DOI 10.1038/sj.emboj.7600494

Chemin J, Patel AJ, Delmas P, Sachs F, Lazdunski M, Honore E (2007) Regulation of the Mechano-Gated K2P Channel TREK-1 by Membrane Phospholipids. *Curr Top Membr* 59:155-70 DOI 10.1016/S1063-5823(06)59007-6

Chemin J, Patel AJ, Duprat F, Sachs F, Lazdunski M, Honore E (2007) Up- and down-regulation of the mechano-gated K(2P) channel TREK-1 by PIP (2) and other membrane phospholipids. *Pflugers Arch* 455:97-103 DOI 10.1007/s00424-007-0250-2

Czirjak G, Toth ZE, Enyedi P (2004) The two-pore domain K⁺ channel, TREK-1, is activated by the cytoplasmic calcium signal through calcineurin. *J Biol Chem* 279:18550-8 DOI 10.1074/jbc.M312229200

Danthi S, Enyeart JA, Enyeart JJ (2003) Modulation of native TREK-1 and Kv1.4 K⁺ channels by polyunsaturated fatty acids and lysophospholipids. *J Membr Biol* 195:147-64 DOI 10.1007/s00232-003-0616-0

Decher N, Kiper AK, Rolfes C, Schulze-Bahr E, Rinné S (2015) The role of acid-sensitive two-pore domain potassium channels in cardiac electrophysiology: focus on arrhythmias. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* 467:1055-1067 DOI 10.1007/s00424-014-1637-5

Du Y, Kiyoshi CM, Wang Q, Wang W, Ma B, Alford CC, Zhong S, Wan Q, Chen H, Lloyd EE, Bryan RMJ, Zhou M (2016) Genetic Deletion of TREK-1 or TWIK-1/TREK-1 Potassium Channels does not Alter the Basic Electrophysiological Properties of Mature Hippocampal Astrocytes In Situ. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 1010.3389/fncel.2016.00013

Ehling P, Cerina M, Budde T, Meuth SG, Bittner S (2015) The CNS under pathophysiologic attack—examining the role of K2P channels. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* 467:959-972 DOI 10.1007/s00424-014-1664-2

Enyeart JJ, Xu L, Danthi S, Enyeart JA (2002) An ACTH- and ATP-regulated background K⁺ channel in adrenocortical cells is TREK-1. *J Biol Chem* 277:49186-99 DOI 10.1074/jbc.M207233200

Enyeart JA, Danthi S, Enyeart JJ (2003) Corticotropin induces the expression of TREK-1 mRNA and K⁺ current in adrenocortical cells. *Mol Pharmacol* 64:132-42 DOI 10.1124/mol.64.1.132

Enyeart JA, Liu H, Enyeart JJ (2010) cAMP analogs and their metabolites enhance TREK-1 mRNA and K⁺ current expression in adrenocortical cells. *Mol Pharmacol* 77:469-82 DOI 10.1124/mol.109.061861

Enyedi P, Czirjak G (2010) Molecular background of leak K⁺ currents: two-pore domain potassium channels. *Physiol Rev* 90:559-605 DOI 10.1152/physrev.00029.2009

Gamper N, Rohacs T (2012) Phosphoinositide sensitivity of ion channels, a functional perspective. *Subcell Biochem* 59:289-333 DOI 10.1007/978-94-007-3015-1_10

Gnatenco C, Han J, Snyder AK, Kim D (2002) Functional expression of TREK-2 K⁺ channel in cultured rat brain astrocytes. *Brain Res* 931:56-67 DOI

Hille B, Dickson EJ, Kruse M, Vivas O, Suh BC (2015) Phosphoinositides regulate ion channels. *Biochim Biophys Acta* 1851:844-56 DOI 10.1016/j.bbalip.2014.09.010

Honore E, Maingret F, Lazdunski M, Patel AJ (2002) An intracellular proton sensor commands lipid- and mechano-gating of the K(+) channel TREK-1. *Embo j* 21:2968-76 DOI 10.1093/emboj/cdf288

Honore E (2007) The neuronal background K2P channels: focus on TREK1. *Nat Rev Neurosci* 8:251-61 DOI 10.1038/nrn2117

Hossain MI, Iwasaki H, Okochi Y, Chahine M, Higashijima S, Nagayama K, Okamura Y (2008) Enzyme domain affects the movement of the voltage sensor in ascidian and zebrafish voltage-sensing phosphatases. *J Biol Chem* 283:18248-59 DOI 10.1074/jbc.M706184200

Hwang EM, Kim E, Yarishkin O, Woo DH, Han KS, Park N, Bae Y, Woo J, Kim D, Park M, Lee CJ, Park JY (2014) A disulphide-linked heterodimer of TWIK-1 and TREK-1 mediates passive conductance in astrocytes. *Nat Commun* 5:3227 DOI 10.1038/ncomms4227

Kang D, Han J, Kim D (2006) Mechanism of inhibition of TREK-2 (K2P10.1) by the Gq-coupled M3 muscarinic receptor. *Am J Physiol Cell Physiol* 291:C649-56 DOI 10.1152/ajpcell.00047.2006

Kang D, Choe C, Cavanaugh E, Kim D (2007) Properties of single two-pore domain TREK-2 channels expressed in mammalian cells. *J Physiol* 583:57-69 DOI 10.1113/jphysiol.2007.136150

Kim Y, Gnatenco C, Bang H, Kim D (2001) Localization of TREK-2 K⁺ channel domains that regulate channel kinetics and sensitivity to pressure, fatty acids and pHi. *Pflugers Arch* 442:952-60 DOI

Lauritzen I, Chemin J, Honore E, Jodar M, Guy N, Lazdunski M, Jane Patel A (2005) Cross-talk between the mechano-gated K2P channel TREK-1 and the actin cytoskeleton. *EMBO Rep* 6:642-8 DOI 10.1038/sj.embor.7400449

Lesage F, Lazdunski M (2000) Molecular and functional properties of two-pore-domain potassium channels. *Am J Physiol Renal Physiol* 279:F793-801 DOI 10.1152/ajprenal.2000.279.5.F793

Lesage F, Terrenoire C, Romey G, Lazdunski M (2000) Human TREK2, a 2P domain mechano-sensitive K⁺ channel with multiple regulations by polyunsaturated fatty acids, lysophospholipids, and Gs, Gi, and Gq protein-coupled receptors. *J Biol Chem* 275:28398-405 DOI 10.1074/jbc.M002822200

Lesage F, Barhanin J (2011) Molecular physiology of pH-sensitive background K(2P) channels. *Physiology (Bethesda)* 26:424-37 DOI 10.1152/physiol.00029.2011

Levitz J, Royal P, Comoglio Y, Wdziekonski B, Schaub S, Clemens DM, Isacoff EY, Sandoz G (2016) Heterodimerization within the TREK channel subfamily produces a diverse family of highly regulated potassium channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113:4194-9 DOI 10.1073/pnas.1522459113

Liu H, Enyeart JA, Enyeart JJ (2007) Angiotensin II inhibits native bTREK-1 K⁺ channels through a PLC-, kinase C-, and PIP2-independent pathway requiring ATP hydrolysis. *Am J Physiol Cell Physiol* 293:C682-95 DOI 10.1152/ajpcell.00087.2007

Logothetis DE, Petrou VI, Adney SK, Mahajan R (2010) Channelopathies linked to plasma membrane phosphoinositides. *Pflugers Arch* 460:321-41 DOI 10.1007/s00424-010-0828-y

Lopes CM, Rohacs T, Czirjak G, Balla T, Enyedi P, Logothetis DE (2005) PIP2 hydrolysis underlies agonist-induced inhibition and regulates voltage gating of two-pore domain K⁺ channels. *J Physiol* 564:117-29 DOI 10.1113/jphysiol.2004.081935

Lopes CM, Remon JJ, Matavel A, Sui JL, Keselman I, Medei E, Shen Y, Rosenhouse-Dantsker A, Rohacs T, Logothetis DE (2007) Protein kinase A modulates PLC-dependent regulation and PIP2-sensitivity of K⁺ channels. *Channels (Austin)* 1:124-34 DOI

Maingret F, Patel AJ, Lesage F, Lazdunski M, Honore E (1999) Mechano- or acid stimulation, two interactive modes of activation of the TREK-1 potassium channel. *J Biol Chem* 274:26691-6 DOI

Maingret F, Lauritzen I, Patel AJ, Heurteaux C, Reyes R, Lesage F, Lazdunski M, Honore E (2000) TREK-1 is a heat-activated background K(+) channel. *EMBO J* 19:2483-91 DOI 10.1093/emboj/19.11.2483

Maingret F, Patel AJ, Lesage F, Lazdunski M, Honore E (2000) Lysophospholipids open the two-pore domain mechano-gated K(+) channels TREK-1 and TRAAK. *J Biol Chem* 275:10128-33 DOI

Mathie A (2007) Neuronal two-pore-domain potassium channels and their regulation by G protein-coupled receptors. *J Physiol* 578:377-85 DOI 10.1113/jphysiol.2006.121582

Mathie A, Veale EL (2015) Two-pore domain potassium channels: potential therapeutic targets for the treatment of pain. *Pflugers Arch* 467:931-43 DOI 10.1007/s00424-014-1655-3

McClenaghan C, Schewe M, Aryal P, Carpenter EP, Baukrowitz T, Tucker SJ (2016) Polymodal activation of the TREK-2 K2P channel produces structurally distinct open states. *J Gen Physiol* 147:497-505 DOI 10.1085/jgp.201611601

Mori MX, Inoue R (2014) New experimental trends for phosphoinositides research on ion transporter/channel regulation. *J Pharmacol Sci* 126:186-97 DOI

Murata Y, Iwasaki H, Sasaki M, Inaba K, Okamura Y (2005) Phosphoinositide phosphatase activity coupled to an intrinsic voltage sensor. *Nature* 435:1239-43 DOI 10.1038/nature03650

Murbartian J, Lei Q, Sando JJ, Bayliss DA (2005) Sequential phosphorylation mediates receptor- and kinase-induced inhibition of TREK-1 background potassium channels. *J Biol Chem* 280:30175-84 DOI 10.1074/jbc.M503862200

Nam JH, Woo JE, Uhm DY, Kim SJ (2004) Membrane-delimited regulation of novel background K⁺ channels by MgATP in murine immature B cells. *J Biol Chem* 279:20643-54 DOI 10.1074/jbc.M312547200

Nam JH, Lee HS, Nguyen YH, Kang TM, Lee SW, Kim HY, Kim SJ, Earm YE, Kim SJ (2007) Mechanosensitive activation of K⁺ channel via phospholipase C-induced depletion of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in B lymphocytes. *J Physiol* 582:977-90 DOI 10.1113/jphysiol.2007.128413

Noel J, Sandoz G, Lesage F (2011) Molecular regulations governing TREK and TRAAK channel functions. *Channels (Austin)* 5:402-9 DOI 10.4161/chan.5.5.16469

Park H, Kim EJ, Han J, Han J, Kang D (2016) Effects of analgesics and antidepressants on TREK-2 and TRESK currents. *Korean J Physiol Pharmacol* 20:379-85 DOI 10.4196/kjpp.2016.20.4.379

Patel AJ, Honore E, Maingret F, Lesage F, Fink M, Duprat F, Lazdunski M (1998) A mammalian two pore domain mechano-gated S-like K⁺ channel. *EMBO J* 17:4283-90 DOI 10.1093/emboj/17.15.4283

Patel AJ, Honore E, Lesage F, Fink M, Romey G, Lazdunski M (1999) Inhalational anesthetics activate two-pore-domain background K⁺ channels. *Nat Neurosci* 2:422-6 DOI 10.1038/8084

Patel AJ, Honore E (2001) Properties and modulation of mammalian 2P domain K⁺ channels. *Trends Neurosci* 24:339-46

Pereira V, Busserolles J, Christin M, Devilliers M, Poupon L, Legha W, Alloui A, Aissouni Y, Bourinet E, Lesage F, Eschalier A, Lazdunski M, Noel J (2014) Role of the TREK2 potassium channel in cold and warm thermosensation and in pain perception. *Pain* 155:2534-44 DOI 10.1016/j.pain.2014.09.013

Piechotta PL, Rapedius M, Stansfeld PJ, Bollepalli MK, Ehrlich G, Andres-Enguix I, Fritzenschaft H, Decher N, Sansom MS, Tucker SJ, Baukrowitz T (2011) The pore structure and gating mechanism of K2P channels. *EMBO J* 30:3607-19 DOI 10.1038/emboj.2011.268

Plant LD, Zuniga L, Araki D, Marks JD, Goldstein SA (2012) SUMOylation silences heterodimeric TASK potassium channels containing K2P1 subunits in cerebellar granule neurons. *Sci Signal* 5:ra84 DOI 10.1126/scisignal.2003431

Renigunta V, Schlichterl G, Daut J (2015) Much more than a leak: structure and function of K(2)p-channels. *Pflugers Arch* 467:867-94 DOI 10.1007/s00424-015-1703-7

Rivas-Ramirez P, Cadaveira-Mosquera A, Lamas JA, Reboreda A (2015) Muscarinic modulation of TREK currents in mouse sympathetic superior cervical ganglion neurons. *Eur J Neurosci* 42:1797-807 DOI 10.1111/ejn.12930

Sandoz G, Thummler S, Duprat F, Feliciangeli S, Vinh J, Escoubas P, Guy N, Lazdunski M, Lesage F (2006) AKAP150, a switch to convert mechano-, pH- and arachidonic acid-sensitive TREK K(+) channels into open leak channels. *EMBO J* 25:5864-72 DOI 10.1038/sj.emboj.7601437

Sandoz G, Douguet D, Chatelain F, Lazdunski M, Lesage F (2009) Extracellular acidification exerts opposite actions on TREK1 and TREK2 potassium channels via a single conserved histidine residue. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:14628-33 DOI 10.1073/pnas.0906267106

Sandoz G, Bell SC, Isacoff EY (2011) Optical probing of a dynamic membrane interaction that regulates the TREK1 channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:2605-10 DOI 10.1073/pnas.1015788108

Segal-Hayoun Y, Cohen A, Zilberberg N (2010) Molecular mechanisms underlying membrane-potential-mediated regulation of neuronal K2P2.1 channels. *Mol Cell Neurosci* 43:117-26 DOI 10.1016/j.mcn.2009.10.002

Steinberg EA, Wafford KA, Brickley SG, Franks NP, Wisden W (2015) The role of K2P channels in anaesthesia and sleep. *Pflügers Archiv* -

European Journal of Physiology 467:907-916 DOI 10.1007/s00424-014-1654-4

Thomas P, Smart TG (2005) HEK293 cell line: a vehicle for the expression of recombinant proteins. J Pharmacol Toxicol Methods 51:187-200 DOI 10.1016/j.vascn.2004.08.014

Zheng H, Nam JH, Nguen YH, Kang TM, Kim TJ, Earm YE, Kim SJ (2008) Arachidonic acid-induced activation of large-conductance potassium channels and membrane hyperpolarization in mouse B cells. Pflugers Arch 456:867-81 DOI 10.1007/s00424-008-0445-1

Zheng H, Nam JH, Pang B, Shin DH, Kim JS, Chun YS, Park JW, Bang H, Kim WK, Earm YE, Kim SJ (2009) Identification of the large-conductance background K⁺ channel in mouse B cells as TREK-2. Am J Physiol Cell Physiol 297:C188-97 DOI 10.1152/ajpcell.00052.2009

Zhuo RG, Liu XY, Zhang SZ, Wei XL, Zheng JQ, Xu JP, Ma XY (2015) Insights into the stimulatory mechanism of 2-aminoethoxydiphenyl borate on TREK-2 potassium channel. Neuroscience 300:85-93 DOI 10.1016/j.neuroscience.2015.05.012

ABSTRACT

TWIK-related two-pore domain K⁺ channels (TREKs) contribute to the negative resting membrane potential as a partial 'leak' K⁺ conductance. TREKs are activated by various physicochemical conditions including membrane stretch, unsaturated fatty acid, temperature and acidic intracellular pH. For the proper activation of TREKs, tonic inhibited state is necessary. However, the determining factors and related molecular structure are not clearly understood yet. Especially, there has been controversy over the direction of regulation by PI(4,5)P₂ that are dynamically generated by phosphatidylinositide (PI) kinases using ATP.

In human TREK-2 and TREK-1, I firstly investigate the exact direction of TREK-2 regulation by PI(4,5)P₂ and the concentration-dependent effects. The proximal C-terminal tail (pCt) of TREKs is known to be critical for their activity. Therefore, in the second part, I investigate the amino acid residues with cationic charges that are required for the PI(4,5)P₂-dependent dual regulation. Thirdly, I investigate anionic residues mediating the activation by acidic pHi, and the interaction between the PI(4,5)P₂- and pHi-dependent regulatory sites.

TREK-1 and TREK-2 currents are commonly increased spontaneously by dialysis with ATP-free pipette solution for whole-cell recording ($I_{\text{TREK,w-c}}$) or by membrane excision for inside-out patch clamp recording ($I_{\text{TREK,i-o}}$). Consistently, both

$I_{\text{TREK-1,i-o}}$ and $I_{\text{TREK-2,i-o}}$ were inhibited by ATP to the cytoplasmic side. The ATP-dependent inhibition was prevented by wortmannin, a PI kinase inhibitor. Also, direct application of $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ strongly inhibited $I_{\text{TREK,i-o}}$. The putative $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ -mediated inhibition of TREK-2 by intracellular ATP was also observed in the intrinsically expressed cells such as astrocytes and B cells. Treatment with polycationic poly-L-lysine (PLL) totally abolished $I_{\text{TREK-2,i-o}}$, then the application of $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ showed dose-dependent dual effects: activation and inhibition by relatively low and high ranges, respectively. When co-expressed with voltage-sensitive $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ phosphatase (Dr-VSP), $I_{\text{TREK-2,w-c}}$ was initially activated and then inhibited by sustained activation of Dr-VSP, further indicating the dual effects of $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ on TREK-2.

To identify the residue(s) of pCt for the ATP-dependent TREK-2 inhibition, site-directed substitution of cationic residues with Ala was introduced to human TREK-2 (hTREK-2). Neutralization of Lys330 (K330A) showed higher basal activity and was not inhibited by ATP. In whole-cell recordings ($I_{\text{TREK-2,w-c}}$), K330A also showed higher basal activity and the further activation by 2APB, arachidonic acid or acidic pHe (6.9) was less significant. On the contrary, neutralization of the three consecutive Arg distal to Lys330 (R355–7A) showed very low basal activity even without ATP. Furthermore, the combined neutralization of Lys330 (K330A) in R355–7A did not rescue the basal activity of hTREK-2. However, the activation of $I_{\text{TREK-2,i-o}}$ by acidic pHi and of $I_{\text{TREK-2,w-c}}$ by 2-APB

and arachidonic acid was consistently observed in R355–7A.

Finally, I investigate the acidic pHi-sensing residues in hTREK-2. Consistent with the previous study of TREK-1, neutralization of a Glu in the pCt of hTREK-2 (E332A) showed higher basal activity and insensitivity to acidic pHi. However, different from hTREK-1, an additional Glu335 of hTREK-2 was contributing to the acidic pHi-sensitivity; E335A showed partial attenuation of the pHi effect. The ITREK-2,w-c of E332A showed fully active basal activity, showing insignificant further activation by 2-APB, arachidonic acid or acidic pHe 6.9. Interestingly, the additional introduction of E335A to R335-7A in hTREK-2 did not rescue the lowered basal activity and lost sensitivity to acidic pHi, while the activation by 2-APB, AA or acidic pH was still observed.

Taken together, the above results show concerted roles of the oppositely charged Lys and Glu in pCt for the ATP-dependent low basal activity and pHi-sensitivity. I suggest that the ATP-dependent intrinsic $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ induces tonic inhibition of TREKs, which might be beneficial for the wide changes of ITREK modulation for physiological responses.

Data were published in *Plugers Arch - Eur J Physiol* (Woo et al., 2016; Woo et al., 2017)

Keywords: Potassium ion channel, TREK channel, C-terminal, $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$, intra cellular pH

Student Number: 2012-21804